



Studi *In Silico* Gen CTX-M15 sebagai Biomarker *Escherichia coli* ESBL

In Silico Study of the CTX-M 15 Gene as a Biomarker for *Escherichia coli* ESBL

Bio Putri Ayanti^{1*}, Novian Adhipurna², Iswiyanti Novita³, & Yustin Ari Prihandini⁴

¹Program Studi Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi, Universitas Borneo Lestari Banjarbaru, Indonesia.

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Borneo Lestari Banjarbaru, Indonesia.

³Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Banjarmasin, Indonesia.

⁴Program Studi Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi, Universitas Borneo Lestari Banjarbaru, Indonesia.

Abstrak

Escherichia coli merupakan bakteri patogen nosokomial paling umum diakui penyebab tertinggi penghasil ESBL Turunan dari CTX-M khususnya tipe CTX-M-15 (*bla*CTX-M-15) sebagai gen penyandi ESBL yang dominan ditemukan diantara isolat *E. coli*. Komponen terpenting dalam PCR adalah primer. Desain primer dapat dilakukan dengan analisis bioinformatika *in silico*. Penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan sekuen primer gen *E. coli* CTX-M-15 sebagai kandidat biomarker deteksi *E. coli* ESBL. Metode yang digunakan adalah *in silico* observasional menggunakan aplikasi Primer3Plus dan PCR *in silico* pada kandidat primer gen CTX-M-15 *E. coli*. Primer dipilih berdasarkan kriteria meliputi %GC, panjang primer, T_m (*melting temperature*), stabilitas, dan interaksi primer (keberadaan *dimers* dan *hairpins*). Sampel yang digunakan berupa sekuens nukleotida *E. coli* gen CTX-M-15 strain K-20 plasmid Genbank: GQ330540.1. Hasil penelitian menunjukkan 2 *pairs* pasangan primer *forward* dan *reverse* (*pairs* 1 dan *pairs* 5) mampu mengamplifikasi sekuen gen *bla*CTX-M-15 berukuran 525bp dan 519bp. Analisis *in silico* PCR menghasilkan 2 *pairs* pasangan primer baru berhasil dirancang berpotensi digunakan sebagai biomarker DNA dari *Escherichia coli* dalam deteksi dini dan cepat infeksi ESBL.

Kata Kunci: *In Silico* PCR; Primer; *Blactx-M-15*; *Escherichia Coli*

Abstract

Escherichia coli is most common nosocomial pathogenic bacteria recognized as the highest cause of ESBL production. Derivatives of CTX-M, especially type CTX-M-15 (*bla*CTX-M-15) as the dominant ESBL-encoding gene found among *E. coli* isolates. The most important component in PCR is primer. Primer design can be done by *in silico* bioinformatics analysis. This study was conducted to produce a primer sequence of *E. coli* CTX-M-15 gene as a candidate biomarker for *E. coli* ESBL detection. The method used was *in silico* observational using the Primer3Plus application and *in silico* PCR on candidate primers for the *E. coli* CTX-M-15 gene. Primers were selected based on criteria including %GC, primer length, T_m (*melting temperature*), stability, and primer interactions (the presence of *dimers* and *hairpins*). The sample used was the nucleotide sequence of the *E. coli* CTX-M-15 gene strain K-20 plasmid Genbank: GQ330540.1. The results showed that 2 *pairs* of forward and reverse primer *pairs* (*pairs* 1 and *pairs* 5) were able to amplify the *bla*CTX-M-15 gene sequence measuring 525bp and 519bp. *In silico* PCR analysis resulted in 2 *pairs* of new primer *pairs* being successfully designed and potentially used as DNA biomarkers from *Escherichia coli* in early and rapid detection of ESBL infection.

Keywords: *In Silico* PCR; Primer; *Blactx-M-15*; *Escherichia Coli*

How to Cite: Ayanti, B.P., Adhipurna, N., Novita, I., & Prihandini, Y.A. (2024). Studi *In Silico* Gen CTX-M15 sebagai Biomarker *Escherichia coli* ESBL Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA), 6(2) 2024: 142-152

*E-mail: Bioputriayanti.analis@gmail.com

ISSN 2722-9777 (Online)



PENDAHULUAN

Escherichia coli merupakan bakteri patogen nosokomial paling umum dalam menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) dan diakui secara global menduduki penyebab tertinggi penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBL) (Abayneh *et al.*, 2018; Qureshi & Doi, 2014). ESBL merupakan enzim yang diproduksi di dalam plasmid bakteri Gram negatif dari kelompok *Enterobacteriaceae* yang secara global diklasifikasikan menjadi beberapa tipe yaitu CTX-M, SHV, BEL, PER, TEM, OXA dan lainnya. Enzim CTX-M β -laktamase paling banyak diperoleh dari isolat bakteri pada manusia dan dilaporkan sebagai penular infeksi pada masyarakat (Doi *et al.*, 2017; Jena *et al.*, 2017).

Dalam perkembangannya, penyebaran ESBL didunia semakin meningkat dan menjadi permasalahan serius di rumah sakit. Akibat dari penggunaan antibiotik yang tidak rasional, adanya kolonisasi bakteri, lamanya perawatan di rumah sakit, kateterisasi yang sebelumnya tidak terkontrol, peningkatan keparahan penyakit serta adanya faktor komorbiditas penyakit sebelumnya (Abayneh *et al.*, 2018; Qureshi & Doi, 2014). ESBL tipe CTX-M dapat memberikan resistensi terhadap sebagian besar antibiotik beta-laktam termasuk cefotaxime, cefriakson, cefquinome dan sefalosporin spektrum luas. CTX-M diketahui sangat aktif dalam menghidrolisis sefotaksim dan seftazidim. Turunan dari CTX-M khususnya tipe CTX-M-15 (*bla*CTX-M-15) sebagai gen penyandi ESBL dominan ditemukan diantara isolat *E.coli* (Khorvash *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017; Widodo *et al.*, 2020). Berbagai laporan sebelumnya menyebutkan, *bla*CTX-M-15 sebagai endemi global di berbagai negara dan menjadi penyebab wabah infeksi nosokomial dan mortalitas (Doi *et al.*, 2017).

Upaya pengendalian dan pencegahan penyebaran infeksi serta epidemi bakteri penghasil ESBL dengan metode pengujian yang cepat, tepat dan akurat sangat penting dilakukan. Uji resistensi bakteri secara konvensional terbatas pada uji kerentanan antimikroba, uji skrining dan konfirmasi ESBL memerlukan waktu yang cukup lama. Seiring berkembangnya teknologi, tes diagnostik berbasis PCR lebih cepat dan tepat dalam menilai penyebaran suatu penyakit. Namun, keberhasilan dalam pengujian menggunakan PCR untuk mendeteksi suatu gen bakteri ataupun virus, salah satunya didukung dengan penggunaan primer yang tepat (Van Weezep *et al.*, 2019). Desain primer dapat dilakukan dengan analisis bioinformatika *in sillico*. Desain primer *in*

in silico memberikan kemudahan dalam memperoleh primer yang baik untuk proses amplifikasi fragmen gen. Analisis bioinformatika *in silico* melibatkan penggunaan alat komputasi dan database untuk memeriksa kualitas primer yang dirancang, serta dapat mendeteksi potensi permasalahan seperti pembentukan primer-dimer, hairpin, dan hasil negatif palsu atau positif palsu dapat dihindari (Bogomazova *et al.*, 2023).

Dalam kasus ini, potensi dari primer sebagai penanda DNA dari CTX-M-15 yang dirancang akan diuji. Biomarker ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memfasilitasi secara cepat dan akurat diagnosis berbasis molekuler dalam menegakkan keberadaan *E. coli* ESBL menggunakan PCR *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga April 2023 di Laboratorium Universitas Borneo Lestari. Penelitian ini menggunakan metode *in silico* observasional dengan aplikasi Primer3Plus dan alat PCR *in silico* untuk memprediksi potensi primer sebagai penanda DNA dari gen CTX-M-15 pada *E. coli*. Pengujian dilakukan antara Februari hingga April 2023 di Laboratorium Universitas Borneo Lestari. Bahan penelitian mencakup sekuens nukleotida gen CTX-M-15 *E. coli* strain K-20 plasmid yang diperoleh dari database NCBI dengan kode akses Genbank: GQ330540.1 dalam format FASTA. *Sekuens* kemudian dianalisis dan dirancang primernya menggunakan aplikasi Primer3Plus (Yuliani & Jannah, 2018).

Primer yang dihasilkan terdiri dari primer *forward* dan *reverse*, dengan sifat-sifat seperti suhu leleh (T_m), self-annealing, kandungan GC, GC clamp, potensi dimer, dan hairpin dihitung menggunakan *oligocalculator* (Trianom *et al.*, 2018). Primer tersebut kemudian diuji secara *in silico* menggunakan perangkat lunak PCR *online* di <http://insilico.ehu.es/PCR/> (Ethica *et al.*, 2019).

Pada proses *in silico*, primer dimasukkan ke dalam kolom Primer 1 dan Primer 2 untuk dianalisis. DNA genom bakteri ditetapkan dengan panjang pita maksimum 3.000 nukleotida. Analisis akhir dilakukan untuk mengonfirmasi apakah produk PCR *in silico* (amplikon) sesuai dengan spesies *E. coli* dan dapat digunakan sebagai penanda DNA. Hasil amplifikasi *in silico* dikonfirmasi melalui elektroforesis gel untuk memastikan kesesuaian posisi primer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Urutan FASTA CTX-M-15 diambil dari urutan genom *E. coli* strain K-20 plasmid (Referensi NCBI dengan nomor akses *GenBank*: GQ330540.1) yang terlihat pada Gambar 1.

```
>GQ330540.1 Escherichia coli strain K-20 plasmid IncF:A/C insertion sequence IS26
transposase trnAI526 (trnAI526) gene, complete cds; insertion sequence IS26pl, complete
sequence; and beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M-15) and hypothetical protein genes,
complete cds
AGGCCTTACATTTCAAAAACCTGCTTACCAGGCGCATTTTCGCCAGGGGATCACATAATAAATGCTG
AGGCCTGGCCTTTGCGTAGTGACGATCACTCAATACCTTTGATGGTGGCGTAAGCCGCTTTCATGG
TTTAAATCCAGGCTGGCGTTGATATCCGTTTCAGTTTGGCATGATCGCATCAATCACGTTGTTCCGG
TACTTAATCTGCTGGGTTCAACGTCAGACGGGCGCCGCTTCCGCTTTGAGCAGAGCAAGCGCGCAC
CATAGCGGGCGCTTATCCGTTGATGAATCGGGATCGCCACTTCTCACGTTGTTGAGGATTTT
ACCAGAAACCAGGATGACGCTTTCGTTTACGACGGGAGAGATAAAAAATCGACAGTGGCCGCCCGG
CTGTGACGGCCCGGTACAGATACGCCAGCGGCAATGACCTTCACTAGGTTTTCATCGATGTCACG
GGCAAAAGTCGGAAAGTTACGCCAGTACGCGACGCGTTTTTCCATTTCAAGCGCATACGCTGAAAC
CCAGCGGTAATCGTGGAGTATGACATCACTCCGCTTCAAGCAGCATCTCCGACGCTACGGTAA
CTGAGCCGATTTGAGTACACGCTACGGCCACAGAAATGATCAGCTGAAAATGCCGCTTTGA
ATGGGTTGATGTCAGCTCCATCAGCAAAAGGGGATGATGATTTATCACCCAGCTATTTGCAACAGT
GCCACAAATACACTTTCCTTCTGAAAAGTAGTTATATACATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAAC
ATATCAAAAGACCAAAATACGACATGGCGTGGTCACTCTTGTCAAAAGTCAATTTTGGCGAATGAAGC
CGTGTTCAAATGATGATGCTTTCATATAACCTATTTTGGTGTTCAGGTTGATTCCTGGACCTTCA
GAATACAGACAGCAAAATAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGATTTCTTTCAGCAAAAATAATCAAAACC
CAAGATATGATATCAAGGATGTCGAAAACCTCCGTCAGAAAGGATGATGAAAATGCTGTTGATA
ATAAGAAATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTCAGAGTTTTATAAGTATCATGTC
AGCAAGATGAAAATCAATGATTTATCAAAAATGATGAAAAGTGGTGTAAATAGTGTACAATGTTGTA
GAAGCAGTCTAAATCTCTGCGAATAGTGTATTTTGAAGCTATAAAAACACAGCGAGATTAAGGGA
CTTTCATGTTGTTTATTTTGTATCTTCCAGAAATAGGAATCCATGGTAAAAAATCACTGCGCCAG
TTACGCTGATGGCGGCAACCTCAGCTGTTTGTAGGAAAGTGTGCGCGTGTATGCGCAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTGCGAATAGAGCGGCACTCGGAGGAGAGAGTGGGTTGGCATTGATTAAC
AGCAGATAATTCGCAAAATCTTTATCGTCTGATGAGCGCTTTCGATGTCAGCAGCAGTAAAGTGTAG
SCCGGCGCGGCTGTGAGAAAGATGAAAGCAACCAATCTGTAAATCAGCAGTGGAGATCAAAA
AATCTGACCTTGTAACTAATAACCGATTCGCGAAAAGCAGCTCAATGGAGATGTCAGTGGCTGAGCT
TAGCGCGGCGCGCTCAGTACAGGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATGCTCAGCTTGGCGCGCG
GCTAGCGTCACCGCTTCCGCCAGAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGCTCGACCTACCGAGCCGACGT
TAAACACGCCATTCCGGGCGATCCGCGTATACCACTCAGCTCGGGCAATGGCGCAAACTTCGGAA
TCTGACGCTGGTAAAGATTTGGGCGACCAACAGGGCGACAGTGGTGGCATGGATGAAAAGCAATAC
ACCGGTGACGAGCATTACAGCTGAGCTGCTCTCTTGGTGTGGGGGATAAAACCGCAGCGGTG
GCTATGGCACCAACGATATCCGCGTATCGGCAAAAGATGTCGCGCGCTGATCTGGTCACTTA
CTTACCAGCCTCAACTAAGCGAAAAGCGTGGGATGATTAAGCGTGGCGGCTAAAATCGTCAAC
GAGCGTTTGAATAGCGGAAAGGAAATGGGAAACTCATTCCGTTTTGTTATCGCTTAGACGGCAAA
AGTCTGTGCGCCACTTGGCTTGGCATACCGGCAATAGCTCCGTTCCGTTCTCTTCCGCT
GGAGCCAGTGGCATAGTCACTGGCAGCACGGGTTGATAGCACGTTGTTACTTCAAAAATATATG
CACCAGTATCAGCGACGACGCGATCCAGGTTCTCGCGCCATCTCCAGCCGTCAGAGTTTCC
CAATATCGCCGATGGTGGGATCCCGGATCGTCAAAATCAGCACCAAGAACGCCCTTAATGG
AACAGTAGCTGAAAGGTTGAGGTTGTCGGTGGCGGCGCAGTGGTCCAGGTCATATCTTCCGCG
TCGGCATTTTACCGCCAGACGCTCGGATTCGATATCACCGTCTTTCAGAAATACGTTGA
```

Gambar 1. Urutan FASTA fragmen DNA CTX-M-15 fragmen gen dari *E. coli* strain K-20 plasmid (*GenBank*: GQ330540.1)

Penggunaan primer3Plus dalam memperoleh pasangan primer menggunakan urutan FASTA DNA CTX-M-15 sebagai input (Gambar 1). Hasil FASTA fragmen DNA CTX-M-15 dari *E. coli* strain K-20 plasmid menghasilkan 5 pasang primer baru untuk dapat dirancang menggunakan alat bantu website Primer3 Plus. Salah satu hasil analisis dari alat bantu *website* Primer3 Plus dapat terlihat pada Gambar 2.

1451	GCTGTATGCG	CARAAGCGGG	ACGTACAGCA	AAAACTTGC	GAATTAGAGC
1501	GGCAGTCGGG	AGGCAGACTG	GGTGTGGCAT	TGATTAACAC	AGCAGATAAT
1551	TGCAAAATAC	TTTATCGTGC	TGATGAGCGC	TTTGGCATGT	GCAGCACCCAG
1601	TAAAGTGATG	GCCGCGGCGG	CGGTGCTGAA	GAAAAGTGAA	AGCGAAACCGA
1651	ATCTGTTAAA	TCAGCGAGTT	GAGATCAAAA	AATCTGACCT	TGTTAATCAT
1701	AATCCGATTG	CGSAAAAGCA	CSTCAATGGG	ACGATGTGAC	TGGCTGAGCT
1751	TAGCGGCGCC	GGGCTACAGT	ACAGCGATAA	CGTGGCGATG	AATTAAGCTGA
1801	TTGCTCACGT	TGGCGGCGCG	GCTAGCGTCA	CCGCGTTCGC	CCGACAGCTG
1851	GGAGACGAAA	CSTTCGGTCT	CGACCGTACC	GAGCCGACST	TAAACACCCG
1901	CATTCCGGCG	GATCCGCGTG	ATACCACTTC	ACCTGGGGCA	ATGGCGCAAA
1951	CTCTGGGGAA	TCTGACGCTG	GGTAAAGCAT	TGGCGGACAG	CCRAAGGGGG
2001	CAGCTGGTGA	CATGGATGAA	AGGCAATACC	ACCGGTGCGAG	CGAGCAATCA
2051	GGCTGGACTG	CCTGCTTCT	GGTGTGGG	GGATAAAAAC	GGCAGCGGTG
2101	GCTATGGCAC	CACCAACGAT	ATCGCGTGA	TCTGGCCAAA	AGATCGTGGG
2151	CCGCTGATTC	TGTTCACTTA	CTTCAACCGAG	CCTCAACCTA	AGCGAGAAAG
2201	CCGTCGCGAT	GTATTAGCGT	CGGCGGCTAA	AATCGTCAAC	GAGCGTTTGT
2251	AATAGCGGAA	ADGGAATGGG	GAAACTCATT	CGGTTTTTGT	TTATCGCCTT
2301	AGACGGGAAA	ASTGCTGTG	CCCACCTGCG	CTTGGCATA	CCAGGCCATA
2351	AGCTCCGTTG	TTCTGGTTC	TCTTCCGCT	GGAGCCAGT	GGCGATAGTC
2401	ATCGGACGCC	ACGGGTTGAT	AGCCACCGTG	TTTTACTTCA	AAAATATG
2451	CACCGGTATC	CAGCGACAGC	ACGGCATGCC	AGGTTCTGTC	GGCATCTCC
2501	AGCACCGTAC	AGGTTTCCCC	CAATATGCCC	CGATGGGTGA	CGGTACCCCG
2551	ATCGTCAAAA	TTACGACCCA	CGAAAAGACC	CCTTAATGCC	AACAGTAGCT
2601	CGAAGGTTG	AGGTTGTCGG	TGCGGGCGCA	CGTAGTCCC	AGGTCATATT
2651	CCTTCCGGCG	TCCGGCATT	TACCGCCAGA	CAGCTCGGGA	TTGTTGATAT
2701	CACCGTCTCT	GCAGAAATACG	GTCA		

Gambar 2. Hasil primer desain baru menggunakan alat bantu desain primer Primer3Plus berdasarkan urutan fragmen gen *CTX-M-15* dari *E. coli* strain K-20 plasmid (warna biru dan kuning)

Desain primer urutan DNA CTX-M 15 menggunakan *tools* Primer3Plus menghasilkan 5 pasangan primer baru disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Desain primer urutan DNA CTXM-15 menggunakan Primer3Plus

Pairs	Forward Primer	Reverse Primer	Ukuran amplikon (bp)	DNA <i>E.coli</i> strain amplified (code number)
1	CACCCAGCCTCAACCTAAGG	ATCAGGAATCCCGAGCTGTC	525	25, 35
2	TGCGGAAAAGCACGTCAATG	ATACATCGCGACGGCTTTCT	506	25, 35
3	CTGCTTACCAGGCGCATTTTC	ACTCCACGATTTACCCTGG	559	7,23,25, 33-36, 44-46 dan 49-55
4	ACCCAGAAACGGTATGCAG	CGGCTTCATTGCCCAAAAT	562	34,36,45 dan 51
5	TCCTGGGTTGTGGGGGATAA	TAAGGGTTCGTTTCGTGGTG	519	25,35

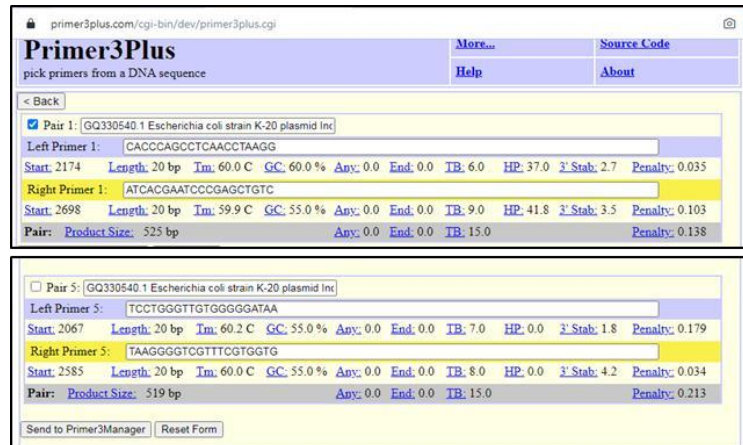
Berdasarkan Tabel 1, hasil primer desain baru yang diperoleh dari analisis menggunakan website Primer3Plus menghasilkan 5 *pairs* pasangan primer baru DNA CTXM-15 yang dapat digunakan sebagai pilihan primer berukuran 506 hingga 562bp. Pasangan primer baru pada Tabel 1 yang telah dirancang selanjutnya diuji *in silico* PCR yang dijalankan pada web <http://insilico.ehu.es/PCR/>. Urutan genom 65 anggota strain *Escherichia* spp. yang tersedia pada database *in silico* PCR disajikan pada Tabel 2.

- | | |
|---|--|
| 1 - <i>Escherichia blattae</i> DSM 4481 | 26 - <i>Escherichia coli</i> K-12 substr. W3110 |
| 2 - <i>Escherichia coli</i> O127:H6 E2348/69 | 27 - <i>Escherichia coli</i> KO11FL |
| 3 - <i>Escherichia coli</i> O42 | 28 - <i>Escherichia coli</i> KO11FL |
| 4 - <i>Escherichia coli</i> 536 | 29 - <i>Escherichia coli</i> LF82 |
| 5 - <i>Escherichia coli</i> 55989 | 30 - <i>Escherichia coli</i> LY180 |
| 6 - <i>Escherichia coli</i> ABU 83972 | 31 - <i>Escherichia coli</i> NA114 |
| 7 - <i>Escherichia coli</i> APEC O1 | 32 - <i>Escherichia coli</i> O103:H2 str. 12009 |
| 8 - <i>Escherichia coli</i> APEC O78 | 33 - <i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2009EL-2050 |
| 9 - <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | 34 - <i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2009EL-2071 |
| 10 - <i>Escherichia coli</i> B str. REL606 | 35 - <i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2011C-3493 |
| 11 - <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) | 36 - <i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128 |
| 12 - <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) | 37 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933 |
| 13 - <i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3)pLysS AG | 38 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115 |
| 14 - <i>Escherichia coli</i> BW2952 | 39 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai |
| 15 - <i>Escherichia coli</i> CFT073 | 40 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. TW14359 |
| 16 - <i>Escherichia coli</i> DH1 | 41 - <i>Escherichia coli</i> O26:H11 str. 11368 |
| 17 - <i>Escherichia coli</i> DH1 | 42 - <i>Escherichia coli</i> O55:H7 str. CB9615 |
| 18 - <i>Escherichia coli</i> E24377A | 43 - <i>Escherichia coli</i> O55:H7 str. RM12579 |
| 19 - <i>Escherichia coli</i> ED1a | 44 - <i>Escherichia coli</i> O7:K1 str. CE10 |
| 20 - <i>Escherichia coli</i> ETEC H10407 | 45 - <i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C |
| 21 - <i>Escherichia coli</i> HS | 46 - <i>Escherichia coli</i> P12b |
| 22 - <i>Escherichia coli</i> IAI1 | 47 - <i>Escherichia coli</i> PMV-1 |
| 23 - <i>Escherichia coli</i> IAI39 | 48 - <i>Escherichia coli</i> S88 |
| 24 - <i>Escherichia coli</i> IHE3034 | 49 - <i>Escherichia coli</i> SE11 |
| 25 - <i>Escherichia coli</i> J1886 | 50 - <i>Escherichia coli</i> SE15 |
| | 51 - <i>Escherichia coli</i> SMS-3-5 |
| | 52 - <i>Escherichia coli</i> UM146 |
| | 53 - <i>Escherichia coli</i> UMN026 |
| | 54 - <i>Escherichia coli</i> UMNK88 |
| | 55 - <i>Escherichia coli</i> UT189 |
| | 56 - <i>Escherichia coli</i> W |
| | 57 - <i>Escherichia coli</i> W |
| | 58 - <i>Escherichia coli</i> Xuzhou21 |
| | 59 - <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. DH10B |
| | 60 - <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MDS42 DNA |
| | 61 - <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 |
| | 62 - <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110 |
| | 63 - <i>Escherichia coli</i> str. clone D 114 |
| | 64 - <i>Escherichia coli</i> str. clone D 12 |
| | 65 - <i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 |

*Keterangan: Baris yang disorot adalah urutan genomik strain *Escherichia coli* diantara strain lain (65 strain) dari database *in silico* PCR

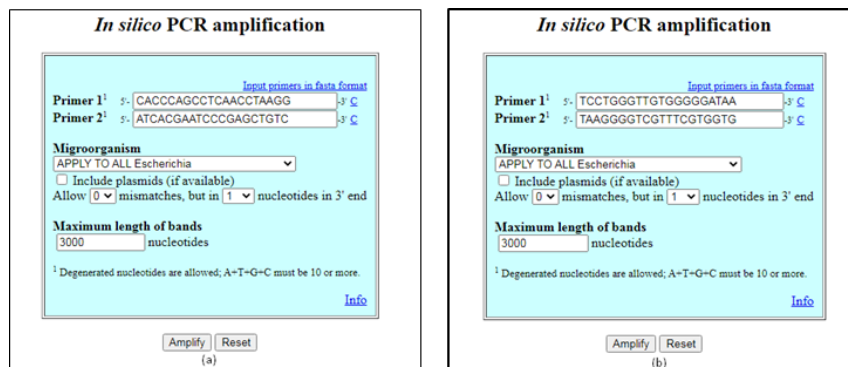
Gambar 3. Urutan genom 65 anggota strain *Escherichia* spp. yang tersedia pada *in silico* PCR

Berdasarkan Gambar 3, analisis *in sillico* PCR yang dilakukan menggunakan pasangan primer baru dan DNA genom *Escherichia* spp. sebanyak 65 *strain* sebagai *template* DNA. Hasil analisis dari alat bantu website primer3Plus dapat terlihat pada Gambar 2 dan hasil analisis pada *website* Primer3Plus menampilkan 2 pasang *pairs* sebagai pilihan primer yang terbaik dari 5 pasang *pairs* desain primer baru yang terbentuk untuk deteksi ESBL *E. coli* disajikan pada Gambar 4.

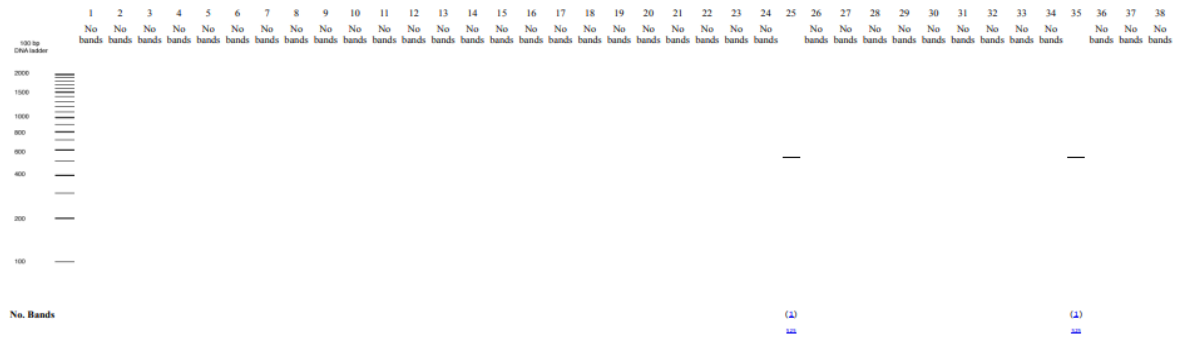


Gambar 4. *Output* Primer3Plus menunjukkan parameter lengkap dari Pair 2 Primer

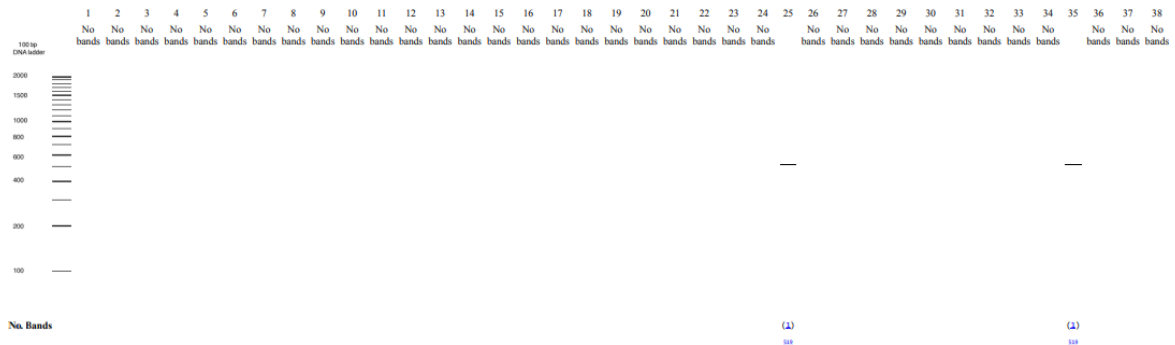
Pengujian terhadap 2 pasang *pairs* primer ini dilanjutkan pada tahap uji *in sillico* PCR memeriksa produk amplikon (pita DNA) terlihat atau tidak pada elektroforesis gel virtual berdasarkan urutan *pairs* primer yang telah diuji kualitasnya pada Gambar 5 serta memprediksi kualitas kandidat primer *Pairs* 1 dan *Pairs* 5 dalam mendeteksi ESBL *E. coli* ditunjukkan pada Gambar 6 dan 7. Analisis selanjutnya juga dilakukan terhadap ukuran amplikon untuk memastikan amplikon adalah bagian asli dari CTX-M15 ESBL *E. coli*. Hasil amplikon *in sillico* PCR menggunakan urutan genom *Escherichia* sebagai *template* ditampilkan pada Gambar 8.



Gambar 5. *In silico* PCR dengan primer desain baru Pairs primer No.1; (b) Pairs Primer No.5
 Gambar 5. Analisis *in silico* PCR primer pairs 1 menghasilkan 2 *single* pita dengan ukuran 525bp milik *strain E. coli* JJ1886



Gambar 6. Analisis *in silico* PCR primer pairs 1 menghasilkan 2 *single* pita dengan ukuran 525bp milik strain *E. coli* JJ1886



Gambar 7. Analisis *in silico* PCR primer pairs 5 menghasilkan 2 *single* pita 519bp strain *E. coli* O104:H4 str. 2011C-3493

Genome: **Escherichia coli JJ1886**
 Start position: 1474638
 End position: 1475162
 Length: 525

DNA sequence

```
>NC_022648, from 1474638 to 1475162 (525 bp); Escherichia coli JJ1886
CACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGATTAGCGTCGGCGCTAAAAATGTCACCGAC
GGTTTGTAAATAGCGGAAACGGAAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAAGT
GCTGTGCGCCCACTGCGCTTGCGCATACCAAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCTCTGGTTCCTCCGCTGGA
GCCAGTGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGTCTTACTTCAAAAATTATGCCAC
CGSTATCCAGCGACAGCAGCGATSCAGGTTCCGCGSCCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAA
TATCGCCGATGGGTGACGGTACCCGATGTCAAAATTCAGCACCAAGAACGCCCTTAAATGGCAAC
AGTAGCTGAAGGTGTGAGGGTGTGCGGTGCGGCGCACGTAGTCCAGGTATATTCTTCCGGCGTCC
GGCATTTTACCGCCAGACAGCTCGGGATTCTGTAT
```

[Translate to protein](#)
[Restriction digest](#)
[BLAST](#)
[Design primers with primer3](#)

Gene(s) or part of gene(s) amplified:
 ORF.. 1473842-1474717 [Sequence P423_07345 - beta-lactamase](#)

Gambar 8. Hasil amplikon *in silico* PCR dengan urutan genom *Escherichia* sebagai *template* menggunakan 2 primer *pairs* baru

Kualitas (spesifisitas) masing-masing produk primer baru harus dianalisis secara otomatis meliputi suhu leleh (*Temperature melting/TM*), panjang dan sifat primer yang dirancang, keberadaan *self-annealing*, %GC, ada tidaknya terbentuk *GC Clamp*, potensi terbentuknya dimmer serta hairpin yang dapat dihitung menggunakan *oligocalculator* (Bogomazova *et al.*, 2023; Ethica *et al.*, 2019; Van Weezep *et al.*, 2019). Primer yang baik terdiri dari 18-30 pasang basa. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam

perancangan primer untuk mengoptimalkan hasil amplifikasi, yaitu terbebas dari pembentukan struktur sekunder (hairpin dan dimer), besarnya ampikon, panjang primer dan *temperature melting* (T_m). Nilai dari kandungan GC yang disarankan yaitu 50-60%. Hasil desain primer dalam penelitian ini memiliki %GC yang telah memenuhi syarat. Kandungan atau %GC akan berpengaruh pada ikatan antar untai DNA. %GC yang tinggi akan mengakibatkan terbentuknya ikatan antar untai DNA menjadi kuat akibat GC mengandung lebih banyak ikatan antar nukleotida daripada A(Adenin) T(Timin) sehingga akan berpengaruh pada nilai T_m , dan sebaliknya apabila primer memiliki %GC yang rendah, maka dapat menurunkan efisiensi proses PCR karena primer tidak mampu bersaing secara efektif untuk menempel pada *template* (Masnaini *et al.*, 2023).

Primer yang memiliki suhu leleh (T_m) yang terlalu tinggi (melebihi 70°C) akan mudah mengalami *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan) pada temperatur rendah sedangkan apabila primer memiliki T_m rendah tidak akan dapat bekerja pada temperatur tinggi. Suhu leleh pada masing-masing primer hasil desain telah memenuhi syarat acuan. Perbedaan suhu T_m antar dua primer yang diperbolehkan adalah tidak lebih dari 5°C. Hal ini akan menjamin diperolehnya temperatur *annealing* yang tepat dan spesifik dalam proses PCR (Bogomazova *et al.*, 2023; Sasmito *et al.*, 2014). Reaksi PCR juga sebaiknya tidak mengandung *secondary structures*, berupa hairpin atau dimer. Keberadaan formasi hairpin dalam primer merupakan interaksi intramolekuler dalam primer. Struktur hairpin dalam primer yang dirancang dapat mengganggu proses penempelan primer pada DNA *template* dalam proses PCR. Interaksi hairpin pada primer sama sekali tidak diperbolehkan (Sasmito *et al.*, 2014).

Hasil desain primer untuk deteksi gen CTXM-15 ESBL *E. coli* diperoleh 5 pasang primer, namun hanya 2 pasang primer baru (*pairs* No.1 dan *pairs* No.5) yang tidak terdapat hairpin sehingga primer ini cukup baik digunakan dalam proses PCR *in vitro*. Selain pembentukan hairpin yang harus diperhatikan, pembentukan dimer juga harus diperhatikan. Apabila ditemukan pembentukan struktur dimers menunjukkan adanya hibridisasi antara basa primer yang identik. Adanya pembentukan dimer pada primer dapat menyebabkan DNA polimerase akan dapat mengikat bagian yang identik dan memperpanjang kedua arah. Hal tersebut mengakibatkan penurunan efisiensi amplifikasi bahkan produk yang dihasilkan tidak sesuai dengan keinginan. Adanya dimers pada ujung 3' dapat menghambat proses amplifikasi dimulai dari ujung 3' sehingga dapat

mengurangi serta tidak terbentuknya produk PCR. Hairpin memiliki kesamaan dengan dimers namun hairpin ditemukan pada ujung-ujung primer yang saling berkomplemen. Spesifitas primer dipengaruhi oleh beberapa faktor penting yaitu suhu penempelan dan panjang primer (Ramadhanil *et al.*, 2023; Sasmito *et al.*, 2014).

Hasil analisis tersebut diperoleh 2 pasang *pairs* primer yang baik (Gambar 4) karena jumlah GC content diatas 50%, tidak ditemukan formasi hairpin, tidak ada *self-annealing* (komplementari) dan tidak ada formasi dimerisasi pada masing-masing primer *Forward* dan *Reverse*. Pengujian terhadap 2 *pairs* primer ini dilanjutkan pada tahap uji *in silico* PCR memeriksa produk amplicon (pita DNA) terlihat atau tidak pada elektroforesis gel *virtual* berdasarkan urutan *pairs* primer yang telah diuji kualitasnya pada Gambar 5. Analisis *in silico* adalah langkah awal dalam pengembangan metode deteksi gen menggunakan prediksi komputasi serta mensimulasikan penempelan sekuen primer pada sekuen DNA template, sehingga dapat mencegah kesalahan pada saat melakukan PCR *in vitro* (Chuang *et al.*, 2013; Chukwuemeka *et al.*, 2020). Produk amplicon dari *in silico* PCR menghasilkan pita DNA terbentuk oleh *pairs* primer no.1 sebesar 525-bp dan *pairs* primer no.5 sebesar 519-bp (Gambar 6 dan 7).

Desain primer *in silico* dilakukan guna mendapatkan produk primer yang memenuhi syarat primer yang baik dan ideal untuk amplifikasi PCR *in vitro*. Berdasarkan kriteria primer ideal, kandidat 2 pasangan primer yang diperoleh telah memenuhi persyaratan primer yang baik. Hasil desain primer ini juga harus diuji melalui serangkaian optimasi di laboratorium *in vitro*. Terdapat beberapa hal yang menjadi keterbatasan dalam desain primer *in silico* yang harus diperhatikan antara lain kualitas akurasi dan kelengkapan *database* yang digunakan, variasi genetik antar spesies dan interaksi primer dan target yang mirip atau identik. Keuntungan dari perancangan primer baru adalah para peneliti dapat memastikan kinerja dalam mengoptimalkan metode dan menghindari kegagalan proses atau data eksperimen (Masnaini *et al.*, 2023; Ramadhanil *et al.*, 2023).

Pemeriksaan ukuran amplicon harus dilakukan untuk memastikan amplicon adalah bagian asli dari CTX-M15 ESBL *E. coli* (Gambar 8). Hal tersebut dapat dikarenakan pada *in silico* PCR menghasilkan amplicon DNA namun bukan gen yang ditargetkan (Ethica *et al.*, 2019). Langkah ini juga menegaskan tentang primer, bahwa 2 *pairs* kandidat pasangan primer baru yang dirancang dan dipilih dari gen CTX-M-15 yang ditargetkan dari *E.coli* ESBL dapat diproduksi pada *in silico* PCR.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis *in sillico* PCR diperoleh 2 kandidat *pairs* pasangan primer yang didesain dengan produk berukuran 525-bp dan *pairs* primer berukuran 519-bp tersebut dapat berpotensi digunakan sebagai biomarker DNA dari bakteri *E. coli* ESBL dalam deteksi dini dan cepat infeksi ESBL.

DAFTAR PUSTAKA

- Abayneh, M., Tesfaw, G., & Abdissa, A. (2018). Isolation of Extended-Spectrum β -lactamase- (ESBL-) Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Patients with Community-Onset Urinary Tract Infections in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/4846159>.
- Bogomazova, A., Krylova, E., Soltynskaya, I., Prasolova, O., & Ivanova, O. (2023). In silico analysis to develop PCR assays for identification of bacterial pathogens in animals: what can we improve? *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1235837>.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.
- Chukwuemeka, P. O., Umar, H. I., Olukunle, O. F., Oretade, O. M., Olowosoke, C. B., Akinsola, E. O., Elabiyi, M. O., Kurmi, U. G., Eigbe, J. O., Oyelere, B. R., Isunu, L. E., & Oretade, O. J. (2020). *In silico design and validation of a highly degenerate primer pair : a systematic approach*.
- Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24, 44–51. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw102>.
- Ethica, S. N., Sulistyanyngtyas, A. R., & Darmawati, S. (2019). In-silico specificity comparison between GMF-GMR and JMF-JMR primers for detecting *moaC* genes of food spoilage bacteria *pseudomonas* spp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 292(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012033>.
- Jena, J., Sahoo, R. K., Debata, N. K., & Subudhi, E. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech*, 7(4), 244. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0879-2>.
- Khorvash, F., Shokri, D., Soltani, R., & Ehsanpoor, M. (2014). Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria causing nosocomial urinary tract infections in an Iranian referral teaching hospital. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.4103/2279-042X.132703>.
- Kim, J. S., Park, J., Shin, E., Kim, S., Oh, S. S., Yang, H.-J., Kim, D.-W., Oh, K.-H., Kim, Y., Kim, M., Kwon, M. J., Na, K., Lee, J., Cho, E., Kang, B.-H., Kwak, H.-S., Seong, W. K., & Kim, J. (2017). Outbreak of CTX-M-15 Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H20 in the Republic of Korea in 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9), 13–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00339-17>.
- Masnaini, M., Achyar, A., Chatri, M., Putri, D. H., Ahda, Y., & Irdawati. (2023). Primer Design and Optimization of PCR Methods for Detecting Mixed Rat Meat in Food Samples. *International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021)*, 32, 282–289. https://doi.org/10.2991/978-94-6463-166-1_37
- Qureshi, Z. A., & Doi, Y. (2014). *Escherichia coli* sequence type 131: epidemiology and challenges in treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(5), 597–609. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.899901>.
- Ramadhanil, S., Putri, F. R., & Farma, S. A. (2023). Desain primer dan analisis in silico gen glutathione peroxidase-1 pada *Rattus norvegicus*. *Tarumanagara Medical Journal*, 5(2), 374–383. <https://doi.org/10.24912/tmj.v5i2.25751>.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*, V, 93–102.
- Trianom, B., Arwiyanto, T., & Joko, T. (2018). Perancangan Primer Spesifik Subspesies Berbasis Gen Endoglukanase untuk Deteksi *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 22(2), 124. <https://doi.org/10.22146/jpti.32217>.
- van Weezep, E., Kooi, E. A., & van Rijn, P. A. (2019). PCR diagnostics: In silico validation by an automated tool

- using freely available software programs. *Journal of Virological Methods*, 270(January), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.002>.
- Widodo, A., Effendi, M. H., & Khairullah, A. R. (2020). *Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Eschericia coli from livestock*. 11(7), 382–392. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.7.57>.
- Yuliani, D., & Jannah, A. (2018). Primer design and in silico analysis of endoglucanase gene for Bacillus genus. *Proceedings of the 1st International Conference in One Health (ICOH 2017)*, 5(Icoh 2017), 189–193. <https://doi.org/10.2991/icoh-17.2018.37>.