

ABSTRAK

Latar Belakang: Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh bakteri *Leptospira interrogans*. Serovar dari *Leptospira interrogans* berperan dalam patogenesis leptospirosis. Gen *lipL32* adalah gen konservatif yang spesifik pada *Leptospira* patogenik dan menunjukkan variasi antar serovar, sedangkan gen 16S rRNA bersifat konservatif pada seluruh bakteri dan digunakan untuk identifikasi tingkat genus. Kombinasi kedua gen ini dalam *multiplex* PCR memungkinkan deteksi yang spesifik untuk konfirmasi leptospirosis sekaligus jenis serovar yang ada di Indonesia.

Tujuan Penelitian: Merancang dan menganalisis pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen 16s rRNA dan *lipL32* pada *Leptospira interrogans* secara *in silico*.

Metode Penelitian: Penelitian ini menggunakan metode *in silico* dengan mengambil urutan gen 16s rRNA dan *lipL32* dari GenBank NCBI. Data daerah konservatif dianalisis menggunakan MAFFT *version 7* dan Unipro UGENE versi 52. Pasangan primer didapatkan melalui perancangan oleh Primer-BLAST serta dilakukan analisis struktur sekundernya menggunakan NetPrimer. Simulasi *multiplex* PCR secara *in silico* dilakukan menggunakan PrimerPooler. Uji similaritas primer dilakukan dengan menggunakan Nucleotide BLAST.

Hasil Penelitian: Daerah konservatif masing-masing kelompok data berhasil diidentifikasi dan digunakan sebagai cetakan primer. Masing-masing kelompok data didapatkan 10 kandidat primer spesifik dari Primer-BLAST. Setelah dilakukan analisis struktur sekunder didapatkan Primer 3 *Leptospira meyeri*, Primer 4 *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, Primer 8 *Leptospira interrogans* serovar Bataviae dan Primer 9 *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes sebagai primer terbaik. PrimerPooler menunjukkan nilai delta G terkecil yang terbentuk sebesar -1,49 kcal/mol. Uji similaritas menunjukkan masing-masing primer memiliki spesifitas yang tinggi.

Kesimpulan: Kombinasi pasangan Primer 3 *Leptospira meyeri* (F: 5'-CCTAAGATTGACGCTGAAACA-3', R: 5'-CGTTTAGGGCGTGGATTAC-3'), Primer 4 *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (F: 5'-CTTCCTACGGATCTGTGAT-3', R: 5'-CGGCAGGAATCCAAACATAG-3'), Primer 8 *Leptospira interrogans* serovar Bataviae (F: 5'-ACCAGGTGAAGTGAAAGGAT-3', R: 5'-GCTCACACCTGGAATACCT-3'), Primer 9 *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes (F: 5'-TTCTGAGCGAGGACACAATC-3', R: 5'-TACGAACTCCCATTTCAGCG-3') teridentifikasi sebagai kombinasi yang baik untuk *multiplex* PCR dengan struktur yang optimal dan spesifisitas yang baik.

Kata Kunci: Gen 16s rRNA, Gen *LipL32*, *Leptospira interrogans*, PCR, In Silico

ABSTRACT

Background: Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira interrogans*. The serovars of *Leptospira interrogans* play important roles in the pathogenesis of leptospirosis. The *lipL32* gene is a conserved, specific gene found only in pathogenic *Leptospira* spp., with variations among serovars. The 16S rRNA gene is a conserved gene present in all bacteria and is commonly used for genus-level identification. The combination of these two genes in multiplex PCR enables specific detection for confirming leptospirosis as well as identifying circulating serovars in Indonesia.

Objective: To design and analyze specific primer pairs for the amplification of 16S rRNA and *lipL32* genes in *Leptospira interrogans* using an in silico approach.

Methods: This study employed an in silico method by retrieving 16S rRNA and *lipL32* gene sequences from the GenBank NCBI database. Conserved regions were analyzed using MAFFT version 7 and Unipro UGENE version 52. Primer pairs were designed using Primer-BLAST, followed by secondary structure analysis using NetPrimer. Multiplex PCR simulation was performed using PrimerPooler, and primer similarity was evaluated using Nucleotide BLAST.

Results: Conserved regions from each dataset were successfully identified and used as primer templates. A total of 10 candidate primers were obtained for each dataset using Primer-BLAST. Based on secondary structure analysis, Primer 3 (*Leptospira meyeri*), Primer 4 (*Leptospira interrogans* serovar Hardjo), Primer 8 (*Leptospira interrogans* serovar Bataviae), and Primer 9 (*Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes) were selected as the best candidates. PrimerPooler analysis showed the lowest ΔG value of -1.49 kcal/mol. Similarity testing indicated that all primers exhibited high specificity.

Conclusion: The combination of Primer 3 (*Leptospira meyeri*) (F: 5'-CCTAAGATTGACGCTGAAACA-3', R: 5'-CGTTTAGGGCGTGGATTAC-3'), Primer 4 (*Leptospira interrogans* serovar Hardjo) (F: 5'-CTTCCCTACGGATCTGTGAT-3', R: 5'-CGGCAGGAATCCAAACATAG-3'), Primer 8 (*Leptospira interrogans* serovar Bataviae) (F: 5'-ACCAGGTGAAGTGAAAGGAT-3', R: 5'-GCTCACACCTGGAATACCT-3'), and Primer 9 (*Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes) (F: 5'-TTCTGAGCGAGGACACAATC-3', R: 5'-TACGAACTCCCATTTCAGCG-3') was identified as an optimal multiplex PCR primer set with good structural properties and high specificity.

Keywords: 16S rRNA gene, *lipL32* gene, *Leptospira interrogans*, PCR, in silico