

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. *Leptospira sp.*

a. Pengertian bakteri *Leptospira sp.*

Bakteri *Leptospira sp.* berbentuk pegas atau coil dengan ukuran garis tengah 0.1 μm dan panjang 6-20 μm (Setiawan, 2008). *Leptospira* bisa terlihat jelas pada perbesaran 1000x di bawah mikroskop medan gelap atau *Dark Field Microscope*. Bakteri ini tidak bisa diwarnai dengan pewarnaan gram giemsa sehingga harus dilakukan pewarnaan menggunakan pewarnaan silver atau perak (Handayani dkk., 2019)

Leptospira sp. merupakan bakteri motil yang fleksibel dan aktif. Pergerakannya cenderung berputar pada sumbu longitudinal atau berotasi bergantian antara dua ujungnya. Ujung *Leptospira* berbentuk lengkung atau seperti mata pancing. Bakteri ini juga dapat bergerak dengan menekuk atau membengkok dan juga meluruskan (Handayani dkk., 2019). Pergerakan *Leptospira sp.* akan cenderung semakin cepat apabila berada pada kondisi viskositas yang tinggi (Fouts dkk., 2016).

Leptospira sp. merupakan bakteri aerob. Strukturnya terdiri dari membran luar peptidoglikan, membran sitoplasma, dan

sebuah selaput membran luar yang tersusun atas lapisan lemak (Rajapakse, 2022). *Leptospira* memerlukan rantai lemak panjang (*Fatty acid*) sebagai sumber energi dan karbon. Namun, rantai lemak bebas dapat menjadi racun bagi bakteri ini sehingga dibutuhkan albumin sebagai pengikatnya di media (Handayani dkk., 2019).

Bakteri *Leptospira* dapat tumbuh pada suhu 28° - 32° C dengan lingkungan pH normal sekitar 7-8. Struktur *genome* bakteri ini cukup berbeda dengan bakteri spiroket lain seperti *Treponema spp.* *Leptospira* tersusun atas dua kromosom yang mengindikasikan bahwa spesies ini dapat hidup di lingkungan yang luas (Gayathri dkk., 2022)

b. Klasifikasi *Leptospira sp.*

Bakteri *Leptospira* berada dalam filum *Spirochaetota*, kelas *Spirochaetia*, ordo *Leptospirales*, famili *Leptospiraceae*, dan genus *Leptospira*. *Leptospira* dapat diklasifikasikan berdasarkan genotipe dan serovarnya. Berdasarkan genotipenya, *Leptospira* dibagi menjadi 21 spesies dengan 9 diantaranya merupakan patogenik, 5 intermediet, dan sisanya merupakan non-patogenik. Sebagian besar *Leptospira* patogenik diklasifikasikan sebagai *L. interrogans* (Rajapakse, 2022). Kemudian, kelompok tersebut diklasifikasikan lagi menjadi beberapa *serovar* yang merupakan takson terendah. *Serovar* yang memiliki homolog antigenik yang

sama ataupun berkolerasi akan dimasukkan dalam satu serogrup. Namun serogrup ini hanya digunakan untuk kepentingan laboratorium dan tidak ada takson spesifik. *Leptospira interrogans* memiliki lebih dari 250 *serovar* yang berada dalam 25 serogrup (Handayani dkk., 2019) Saat ini, data lengkap sekuensing yang telah tersedia adalah untuk *Leptospira serovar* Lai dan *serovar* Copenhageni (Handayani dkk., 2019).

Indonesia memiliki keberagaman *serovar* *Leptospira interrogans* yang tersebar di berbagai wilayah. Identifikasi *serovar* bakteri *leptospira* sangat penting dalam memahami pola transmisi penyakit, menentukan sumber infeksi, serta merancang strategi pengendalian yang efektif di tingkat lokal maupun nasional. Data jenis *serovar* yang terdapat di Indonesia dapat dilihat di tabel berikut :

Tabel 4. Jenis *Serovar Leptospira interrogans* yang Ada di Indonesia

Jenis Bakteri	Lokasi	Reservoir	Sumber
<i>L. interrogans serovar Icterohaemorrhagiae</i>	Sulawesi Selatan, Ambarawa, DIY, Jakarta, Gresik, Kendari, Makasar, Denpasar, Sulawesi Tengah	Tikus, Manusia, Ayam	(Arasy dkk., 2023; Ardanto dkk., 2018; Manyullei dkk., 2021; Ramadhani & Yunianto, 2012; Wijaya dkk., 2023; Yunianto dkk., 2012)
<i>L. interrogans serovar Bataviae</i>	Sulawesi selatan, Ambarawa, DIY, Jakarta, Bogor, Gresik, Donggala, Kendari, Makasar, Denpasar, Tangerang	Tikus, Anjing, Manusia	(Arasy dkk., 2023; Ardanto dkk., 2018; Lokida dkk., 2016; Manyullei dkk., 2021; Mulyani dkk., 2017; Ramadhani & Yunianto, 2012; Tolistiawaty dkk., 2022; Wijaya dkk., 2023; Yunianto dkk., 2012)
<i>L. interrogans serovar Hardjo</i>	DIY, Gresik, Klaten, Sulawesi Tengah	Tikus, Manusia, Sapi	(Noach & Noach, 2020; Ramadhani & Yunianto, 2012; Susanti dkk., 2019; Widarini & Widodo, 2018; Yunianto dkk., 2012)
<i>L. interrogans serovar Pyrogenes</i>	Ambarawa, DIY, Donggala, Sulawesi tengah	Tikus, Manusia, Anjing	(Mulyani dkk., 2017; Ramadhani & Yunianto, 2012; Tolistiawaty dkk., 2022)
<i>L. interrogans serovar Mini</i>	Makasar, Donggala, DIY, Sulawesi Tengah	Tikus, Manusia, Sapi	(Manyullei dkk., 2021; Noach & Noach, 2020; Ramadhani & Yunianto, 2012; Tolistiawaty dkk., 2022; Widarini & Widodo, 2018)
<i>L. interrogans serovar Djasiman</i>	Makasar, Donggala	Tikus, Manusia	(Manyullei dkk., 2021; Tolistiawaty dkk., 2022)
<i>L. interrogans serovar Bangkinang</i>	Makasar, Donggala	Tikus, Manusia	(Manyullei dkk., 2021; Tolistiawaty dkk., 2022)
<i>L. interrogans serovar Hebdomadis</i>	Makasar, Donggala, DIY	Tikus, Manusia, Sapi	(Manyullei dkk., 2021; Noach & Noach, 2020; Tolistiawaty dkk., 2022)
<i>L. interrogans serovar Tarrasovi</i>	DIY, Jakarta	Anjing, Kucing	(Mulyani dkk., 2018; Ramadhani & Yunianto, 2012)

c. Struktur dan morfologi bakteri *Leptospira*

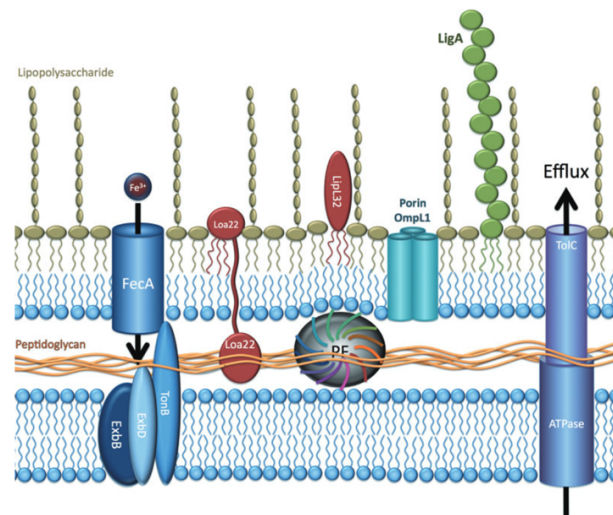
Leptospira berbentuk spiral dengan ujung seperti kail pancing, bentuk inilah yang membedakan *Leptospira* dengan bakteri spiroket yang lain. Dua flagela polar (protein *flaA* dan *flaB*) yang terletak pada ruang periplasma berperan dalam pergerakan bakteri ini. Masing-masing protein *flaA* dan *flaB* berperan dalam pembentukan selubung dan inti flagella (Mohammed dkk., 2011).



Gambar 1. *Leptospira interrogans* serovar copenhageni (Ajay dkk., 2003).

Struktur *Leptospira sp.* terdiri dari membran luar (*outer membrane*), ruang periplasmik, peptidoglikan, dan membran sitoplasma. Pada membran luar terdapat lipopolisakarida (LPS), lipoprotein (LigA, LigB, LenA, LenB, dan Loa22), protein *outer membrane* (OmpL1) dan juga protein *subsurface* LipL (LipL 32, LipL 21, LipL 45, LipL 31, LipL 36, LipL 41). Dengan mengetahui struktur dan fungsi masing-masing protein membran

luar *Leptospira*, maka dapat diketahui patogenesisnya (Haake & Matsunaga, 2010; Mohammed dkk., 2011).



Gambar 2 Struktur Membran *Leptospira* (Haake & Matsunaga, 2010)

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen penyusun utama dari membran luar *Leptospira*. LPS ini merupakan faktor virulensi *Leptospira*. LPS banyak ditemukan pada *L. interrogans* yang menjadi penanda bahwa bakteri tersebut patogen (Haake & Matsunaga, 2010). Mutasi dari LPS juga memberi dampak pada virulensi. Dinding LPS memiliki komponen dengan aktifitas endotoksik yang lebih rendah sehingga dapat mengalami banyak variasi. Variasi pada komponen LPS ini menyebabkan perbedaan *serovar* dan sifat virulensinya (Haake & Matsunaga, 2010).

2. Gen 16s rRNA pada *Leptospira interrogans*

Gen 16s ribosomal RNA atau 16s rRNA adalah gen yang menyandi komponen RNA dari subunit kecil ribosom (30S) pada bakteri. Gen ini memiliki peranan yang penting untuk mensintesis protein. Gen ini bersifat universal dan berada di semua bakteri, termasuk *Leptospira*. Panjang gen ini berkisar antara 1.550 bp dan terdiri atas daerah yang dilestarikan (*conserved region*) dan daerah variabel (*variable region*) (Noer, 2021). Di dalam gen ini terdapat daerah *hypervariable* yang terletak pada 500 bp terakhir dan merupakan ciri khas yang membedakan tiap organisme. Keberadaannya yang universal dan konservatif serta strukturnya yang unik menjadi dasar gen 16s rRNA digunakan sebagai cetakan primer PCR (Rinanda, 2011).

Analisis gen 16s rRNA dapat mengidentifikasi isolat bakteri yang jarang dan dapat mengetahui bakteri patogen baru serta bakteri yang belum dikultur (Janda & Abbott, 2007). Keberhasilan dari gen 16s rRNA untuk mendeteksi bakteri bergantung pada kelengkapan *database* sekuens dan kualitas dari *database* sekuens itu sendiri (Janda & Abbott, 2007). *Leptospira* memiliki 2 gen 16S rRNA yang berada pada kromosom I (CI). Beberapa sekuens 16S rRNA dari *Leptospira* telah tersedia di GenBank, namun beberapa masih berupa sekuens parsial (Morey dkk., 2006).

3. Gen lipL 32 pada *Leptospira interrogans*

Membran luar (OM) merupakan bagian dari *Leptospira* paling depan yang akan berinteraksi dengan sel inang. Struktur membran luar *Leptospira interrogans* tersusun atas lipopolisakarida (LPS), lipoprotein (LigA, LigB, LenA, LenB, dan Loa22), protein *outer membrane* (OmpL1) dan juga protein *subsurface* LipL (LipL 32, LipL 21, LipL 45, LipL 31, LipL 36, LipL 41). Protein LipL memberikan peranan penting dalam deteksi *Leptospira* jenis patogen. Protein lipL32 diketahui hanya terdapat pada bakteri *Leptospira* jenis patogen dan intermediet dan tidak ditemukan pada bakteri non patogen (Haake & Zuckert, 2014).

LipL32 tersusun atas 272 asam amino dan terdeteksi hingga 20% pada membran terluar *Leptospira* (Haake & Zuckert, 2014). Secara struktur, lipL32 mengandung ikatan kalsium yang krusial berikatan dengan sel inangnya. Kalsium sendiri diketahui berperan penting dalam kestabilan membran dan berikatan kovalen koordinasi membentuk Ca^{2+} dengan EDTA yang penting untuk pelepasan OM *Leptospira* (Haake & Zuckert, 2014). LipL32 mengenali dan melekat pada masing-masing komponen matriks ekstraseluler (ECM), termasuk laminin, kolagen I, dan kolagen V sel inang (Chang dkk., 2016).

Leptospira memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi, yang menyebabkan munculnya banyak *serovar* atau variasi antigenik di dalam satu spesies. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan struktur antigenik, terutama pada lipopolisakarida (LPS) yang terdapat di

permukaan sel bakteri (Haake & Matsunaga, 2010). Perbedaan antarserovar juga berpengaruh terhadap faktor virulensi dan ekspresi protein membran luar, termasuk gen lipL32. Meskipun lipL32 bersifat konservatif diantara strain patogenik, urutan nukleotidanya menunjukkan variasi kecil spesifik *serovar* yang dapat memengaruhi sifat imunogenik dan pengikatan pada jaringan inang. Variasi minor ini menjadikan lipL32 bukan hanya penanda keberadaan *Leptospira* patogenik, tetapi juga basis penting dalam identifikasi serovar secara molekuler (Haake & Zuckert, 2014; Khaki dkk., 2023).

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa lipL32 diproduksi sangat banyak baik itu dalam penanaman maupun ketika infeksi *Leptospira* (Haake dkk., 2000). Penelitian itu juga menyebutkan bahwa gen lipL32 lebih banyak ditemukan pada serum manusia yang terinfeksi sehingga dapat digunakan sebagai deteksi serologis leptospirosis (Haake dkk., 2000).

Ketika infeksi leptospirosis terjadi, lipL32 merupakan antigen yang banyak ditemukan sebagai respon imun humoral. Gen ini ditemukan lebih dari 95% dalam serum pasien yang terinfeksi *Leptospira* (Murray, 2013). Hal ini membuat gen lipL32 dapat digunakan sebagai deteksi dan pembuatan vaksin *Leptospira*.

4. Pemeriksaan laboratorium untuk deteksi *Leptospira*

Diagnosis leptospirosis dapat dilakukan dengan beberapa cara pemeriksaan laboratorium. Cara yang paling sering digunakan adalah dengan mendeteksi adanya antibodi *Leptospira* dengan menggunakan *rapid diagnostic test*/RDT atau juga bisa menggunakan *Enxym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Bakteri juga dapat diisolasi dan dikembangbiakan melalui sampel darah, urine ataupun jaringan yang terinfeksi. Untuk sampel jaringan, dapat dilakukan imunofluoresen untuk mendeteksi keberadaan bakteri tersebut. Pemeriksaan secara serologi yang menjadi *gold standart* dalam menegakkan diagnosis leptospirosis adalah *Microscopic Agglutination Test* (MAT) (World Health Organization, 2003). Pemeriksaan terbaru yang dapat digunakan adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan prinsip molekuler (Handayani dkk., 2019).

Jenis pemeriksaan leptospirosis (Handayani dkk., 2019):

a. *Microscopic Agglutination Test* (MAT)

Pemeriksaan MAT didasarkan pada prinsip serologis yakni reaksi antigen-antibodi. Pemeriksaan ini akan melihat aglutinasi antigen-antibodi dalam serum penderita yang direaksikan dengan panel serovar antigen. Keuntungan dari pemeriksaan ini adalah spesifitas yang tinggi namun kekurangannya adalah membutuhkan kultur *Leptospira* hidup. Bakteri ini sangat mudah terkontaminasi baik antara serovar maupun bakteri lain.

Pemeriksaan ini juga membutuhkan titer antibodi yang cukup sehingga tidak dapat mendeteksi infeksi awal leptospirosis. Serovar yang dibutuhkan juga harus spesifik sehingga membutuhkan lebih banyak panel kultur bakteri (Handayani dkk., 2019).

b. Pemeriksaan molekuler

Pada pemeriksaan molekuler, pemeriksaan dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu ekstraksi DNA, PCR konvensional, *Real Time* PCR (qPCR) dan *sequencing* DNA. Teknik PCR merupakan teknik yang banyak diminati karena hasilnya yang akurat dan praktis (Hariastuti, 2011). Metode ini dapat digunakan pada awal infeksi karena sensitifitasnya yang tinggi dan rentang linearitasnya yang cukup luas. Metode ini bermanfaat untuk meningkatkan akurasi survei epidemiologi untuk mencari angka insidensi penyakit (Ningsih & Wahid, 2022).

5. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

a. Pengertian PCR

Teknik *Polymerase Chain Reaction* atau PCR adalah teknik yang sering digunakan dalam biologi molekuler. Pada prinsipnya, teknik PCR ini menggunakan enzim DNA *polymerase* yang bersifat termotabil untuk menggandakan fragmen DNA secara *in vitro* (Kadri, 2020). Teknik ini ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983 dan dipatenkan

pada tahun 1985 (Kadri, 2020). Teknik ini terus mengalami perkembangan hingga saat ini. Teknik ini digunakan dalam menganalisis DNA dalam berbagai bidang termasuk genetika, mikrobiologi, dan diagnostik penyakit (Widodo, 2025). Teknik ini memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi sehingga dapat mendeteksi DNA meskipun jumlahnya sedikit secara cepat dan akurat (Widodo, 2025).

b. Prinsip PCR

Prinsip yang digunakan dalam PCR adalah siklus berulang yang dapat menggandakan target gen. Siklus ini terdiri dari beberapa tahapan yakni *Denaturasi*, *Annaeling*, dan *Elongasi*. Tahapan penting ini bisa terulang dalam 20-30 kali dalam satu siklus (Hasdianah, 2014). Berikut ini adalah tahapan dari PCR:

1) Denaturasi.

Denaturasi terjadi pada suhu tinggi yakni 94-96° C (Hasdianah, 2014). Ikatan hidrogen DNA akan terputus sehingga DNA menjadi untai tunggal. Hal ini dilakukan agar primer dapat menempel pada DNA cetakan yang kemudian enzim DNA *polymerase* dapat mereplikasi DNA (Widodo, 2025).

2) *Annealling*

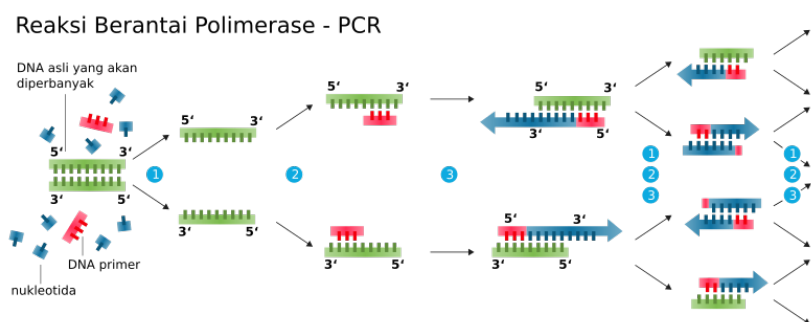
Tahap *annealing* merupakan tahap terjadinya penempelan primer pada DNA cetakan. Tahapan ini memerlukan suhu yang

lebih rendah yakni sekitar 50-65° C. Suhu yang diperlukan harus tepat sesuai dengan primernya. Suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel tidak pada komplementernya (tidak spesifik). Suhu yang terlalu tinggi juga menyebabkan primer tidak dapat menempel pada DNA cetakannya (Widodo, 2025). Suhu *annealing* bergantung pada komposisi fisik dan kimia primernya. Suhu yang tepat ditentukan dengan kisaran suhu leleh primer (T_m) primer (Widodo, 2025). Selama proses *annealing*, primer mengikat urutan komplementer pada DNA untai tunggal dengan memasang ujung 3'nya ke untai cetakan, menyediakan titik awal untuk sintesis DNA (Khehra dkk., 2025).

3) Elongasi

Elongasi merupakan tahap ketika DNA *polymerase* mensintesis untai DNA baru dengan cara menambahkan nukleotida ke primer yang telah menempel pada *template* DNA. Suhu yang digunakan tergantung dari jenis DNA *polymerase* namun biasanya berlangsung pada suhu sekitar 72-76° C (Hasdianah, 2014; Widodo, 2025). Proses ini berlangsung dengan cara DNA *polymerase* menambahkan dNTPs yang komplementer dengan DNA cetakan dengan arah perpanjangan 5' → 3'.

Setelah tahap ini, siklus diulang berkali-kali hingga 30 kali pengulangan (Kadri, 2020; Widodo, 2025). Akibatnya dihasilkan beberapa DNA cetakan baru yang akan menjadi templat bagi primer yang lain. Dari pengulangan siklus ini dihasilkan milyaran salinan DNA (Widodo, 2025).



Gambar 3. Tahapan Reaksi PCR

c. Komponen PCR

Komponen penting yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah:

1) DNA *template*

DNA *template*/cetakan merupakan DNA yang akan digandakan dalam proses PCR. DNA ini berada dalam sel sehingga diperlukan ekstraksi DNA untuk mendapatkan sekuensnya.

2) Primer

Pasangan primer merupakan untai nukleutida yang akan menempel pada untai ganda DNA yang telah didenaturasi. Primer ini akan membatasi reaksi polimerasi DNA. Primer yang digunakan ada dua jenis yakni *forward primer* dan *reverse primer* yang akan mengapit fragmen DNA target sehingga reaksi

polimerasi dapat dibatasi. Primer harus dirancang secara spesifik pada DNA *template*.

3) DNA *polymerase*

Enzim DNA *polymerase* digunakan dalam PCR untuk mengkatalisis sintesis untai DNA baru. Enzim ini bekerja dengan menambahkan nukleotida pada ujung 3' dari primernya. Enzim ini digunakan karena strukturnya yang stabil pada suhu yang tinggi (Widodo, 2025).

4) *Deoksiribonukleotida Trifosfat* (dNTP)

Deoksiribonukleotida Trifosfat (dNTP) adalah molekul yang berperan sebagai *building block* dalam replikasi DNA. dNTP tersusun seperti basa penyusun DNA yakni gula deoksiribosa, basa nitrogen (adenin (A), sitosin (S), guanin (G), atau timin (T)) serta tiga gugus fosfat. Jenis dNTP yaitu dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. DNA *polymerase* menambahkan dNTP ke ujung 3' dari untai DNA yang terbentuk (Widodo, 2025).

5) Buffer

Buffer digunakan untuk mengkondisikan reaksi agar berjalan optimum dan menstabilkan enzim DNA *polymerase*. Umumnya larutan buffer yang digunakan adalah Tris-Cl yang memiliki pH antara 8.3-8.8.

6) Ion Logam

Ion logam bivalen (Mg^{2+}) digunakan sebagai kofaktor bagi enzim DNA *polymerase*. Konsentrasi molar Mg^{2+} harus melebihi konsentrasi molar dari gugus fosfat.

d. *Multiplex* PCR

Multiplex PCR merupakan jenis PCR yang dapat mendeteksi beberapa gen dalam satu reaksi. Hal ini menjadi keunggulan dari *multiplex* PCR karena dapat menghemat waktu dan biaya dibandingkan menggunakan PCR tunggal. Dalam *multiplex* PCR terdapat beberapa set primer yang digunakan dalam satu campuran. *Multiplex* PCR akan menghasilkan *amplicon* dengan berbagai ukuran khusus untuk urutan DNA yang berbeda. Suhu *annealing* yang digunakan harus dikondisikan agar dapat bekerja secara optimal dan dapat mengamplifikasikan DNA target secara spesifik. Sehingga, panjang pasangan basa harus cukup berbeda agar membentuk pita yang berbeda dan dapat diidentifikasi dengan jelas dengan menggunakan elektroforesis gel (Hidayat, 2020).

6. Perancangan Primer

a. Pengertian Primer PCR

Primer merupakan hal yang paling krusial dalam amplifikasi DNA dengan menggunakan teknik PCR. Sepasang primer (*forward* dan *reverse*) yang akan dipolimerisasi masing-masing harus menempel pada target yang benar. Karena itu, primer harus memiliki urutan basa yang

komplementer dengan tingkat homologi yang cukup tinggi dengan masing-masing ujung sekuens yang akan di amplifikasi (Hasdianah, 2014). Untuk melihat homologi atau kesamaan relatif dari suatu gen, dapat digunakan pensejajaran sekuens (*sequence alignment*). Proses *sequence alignment* dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa *software* seperti MAFFT (Alqahtani & Almutairy, 2023; Rozewicki dkk., 2019; Xie dkk., 2023), CLUSTAL (Chenna dkk., 2003; Ferrari & Patrizio, 2021), dan MEGA. Dari *sequence alignment* akan terlihat motif/pola tertentu yang dapat digunakan untuk membuat primer. Daerah tersebut dinamakan daerah konservatif (*conserved area*).

Primer didesain secara *in silico*, yakni dengan menggunakan *software* bioinformatika. *Software* Bioinformatika yang dapat digunakan antara lain Primer3, NetPrimer, PrimerBLAST NCBI, PrimerQuest. Dengan menggunakan perangkat lunak bioinformatika, primer dapat diidentifikasi sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk amplifikasi. Desain primer yang baik dan tepat akan memberikan hasil amplifikasi yang baik pula. Primer yang baik akan membatasi daerah yang akan di amplifikasi sehingga hasil yang didapat akan spesifik. Sekuens primer lebih baik tidak berikatan dengan primer itu sendiri maupun dengan pasangan primernya (Hidayat, 2020).

b. Tahap perancangan primer

Berikut merupakan tahapan umum perancangan primer dari suatu sekuens DNA (Hidayat, 2020):

- 1) Menyiapkan data hasil sekuens gen yang akan dibuat primernya dalam format FASTA, (dapat dilakukan pencarian data sekuens menggunakan website *GenBank*)
- 2) Menentukan bagian sekuens DNA yang spesifik yang akan digunakan dengan melakukan *sequence alignment*
- 3) Meng-*input* kriteria primer yang diinginkan

c. Parameter Primer PCR Konvensional

Berikut ini merupakan parameter yang harus diperhatikan dalam perancangan primer:

1) Panjang primer

Panjang primer yang baik berkisar antara 18-28 basa. Primer yang terlalu panjang hanya akan menambah biaya operasional tanpa meningkatkan spesifisitas yang bermakna. Namun, primer yang terlalu pendek akan menurunkan tingkat spesifisitas primernya dan besar kemungkinan terjadi *mispriming* (primer menempel di tempat yang bukan semestinya) (Hasdianah, 2014).

2) Komposisi primer

Urutan basa nukleotida mempengaruhi spesifisitas primer. Urutan primer harus memiliki komposisi jumlah basa G dan C (GC content) yang ideal sekitar 40-60% untuk menurunkan kesalahan *mispriming* (Aulia dkk., 2023; Hasdianah, 2014). Pasangan basa GC memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat daripada pasangan basa AT. Sehingga, basa A dan T dapat

menurunkan spesifisitas primer karena lebih toleran dengan *mismatch* dan lebih mudah untuk terlepas karena energi yang diperlukan lebih sedikit. Jumlah basa G dan C pada 5 basa terakhir di ujung 3' (*GC Clamp*) yang baik adalah sekitar 3-5 basa G/C. Hal ini akan membantu primer berikatan dengan DNA *template* secara lebih stabil (Rahmawati & Shabrina, 2014). Namun apabila melebihi 5, primer bisa terlipat dan membuat struktur dimer sehingga tidak dapat menempel pada DNA *template*.

3) *Melting Temperature* (TM)

Primer *Melting Temperature* (TM) adalah suhu yang dibutuhkan primer untuk melepaskan ikatan/disosiasi. Pemilihan TM akan berpengaruh dalam pemilihan suhu *annealing*. Pemilihan TM bergantung pada komposisi dan panjang primer dimana basa GC sangat berpengaruh. Formula yang dapat digunakan untuk menghitung TM:

$$T_{mw}(P) = (nG + nC) * 4 + (nA + nT) * 2$$

Keterangan:

$T_{mw}(P)$: Primer Melting Temperature (Tm) Wallace's formula

nG : Jumlah basa G pada primer

nC : Jumlah basa C pada primer

nA : Jumlah basa A pada primer

nT : Jumlah basa T pada primer

GC content : Jumlah presentase basa G dan C pada primer

4) *Primer Annealing Temperature* (T_a)

Primer Annealing Temperature (T_a) adalah suhu yang dibutuhkan agar primer berikatan dengan DNA *template* secara stabil. T_a yang terlalu tinggi akan menyulitkan ikatan primer sehingga produk PCR yang dihasilkan kurang efisien. Namun, suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer akan mengalami *mismatch* dan menurunkan spesifisitasnya. Perhitungan T_a dapat menggunakan formula:

$$T_a = 0.3 \times T_m (P) + 0.7 T_m (\text{Produk}) - 14.9$$

Keterangan

T_a : *Primer Annealing Temperature*

$T_m (P)$: *Primer Melting Temperature*

$T_m (\text{Produk})$: Suhu leleh pada produk PCR

5) *Secondary Structure*

a) *Hairpins*

Hairpins merupakan struktur yang dibentuk oleh interaksi intramolekul dalam primer. *Hairpins* membuat struktur *loops* yang akan menyulitkan primer untuk menempel pada proses PCR. Namun, primer yang tidak memiliki *hairpins* sama sekali cukup sulit diperoleh. Oleh karena itu, *hairpin* pada ujung 3' dengan ΔG (energi yang diperlukan untuk

memecah struktur hairpins) = -2 kcal/mol dan *hairpin* internal $\Delta G = -3$ kcal/mol masih dapat ditoleransi (Rahmawati & Shabrina, 2014).

b) *Self Dimer*

Self dimer adalah kondisi dimana primer berikatan dengan primer lainnya yang sejenis. Primer sebaiknya tidak mempunyai 3 atau lebih basa G atau C pada ujung 3' dimer (Rahmawati & Shabrina, 2014).

c) *Cross Dimer*

Cross dimer merupakan kondisi ketika primer berikatan dengan primer pasangannya (*reverse* dan *forward*). Hal ini dapat terjadi karena adanya bagian yang homolog antara dua utas primer tersebut (Rahmawati & Shabrina, 2014).

6) *Repeats*

Repeats adalah nukleotida yang berulang dalam primer. *Repeats* dapat menyebabkan primer menempel pada tempat yang salah (*mispriming*). *Repeats* dapat ditoleransi ketika pengulangan 2-4 basa, misalnya ATATATAT (Rahmawati & Shabrina, 2014).

7) *Runs*

Primer yang memiliki pengulangan basa secara berurutan disebut dengan *runs*. *Runs* masih dapat ditoleransi apabila tidak melebihi 4 kali. Contoh AGCGGGGGATGGGG memiliki

urutan basa G yang diulang sebanyak 5 kali secara berturut-turut (Rahmawati & Shabrina, 2014).

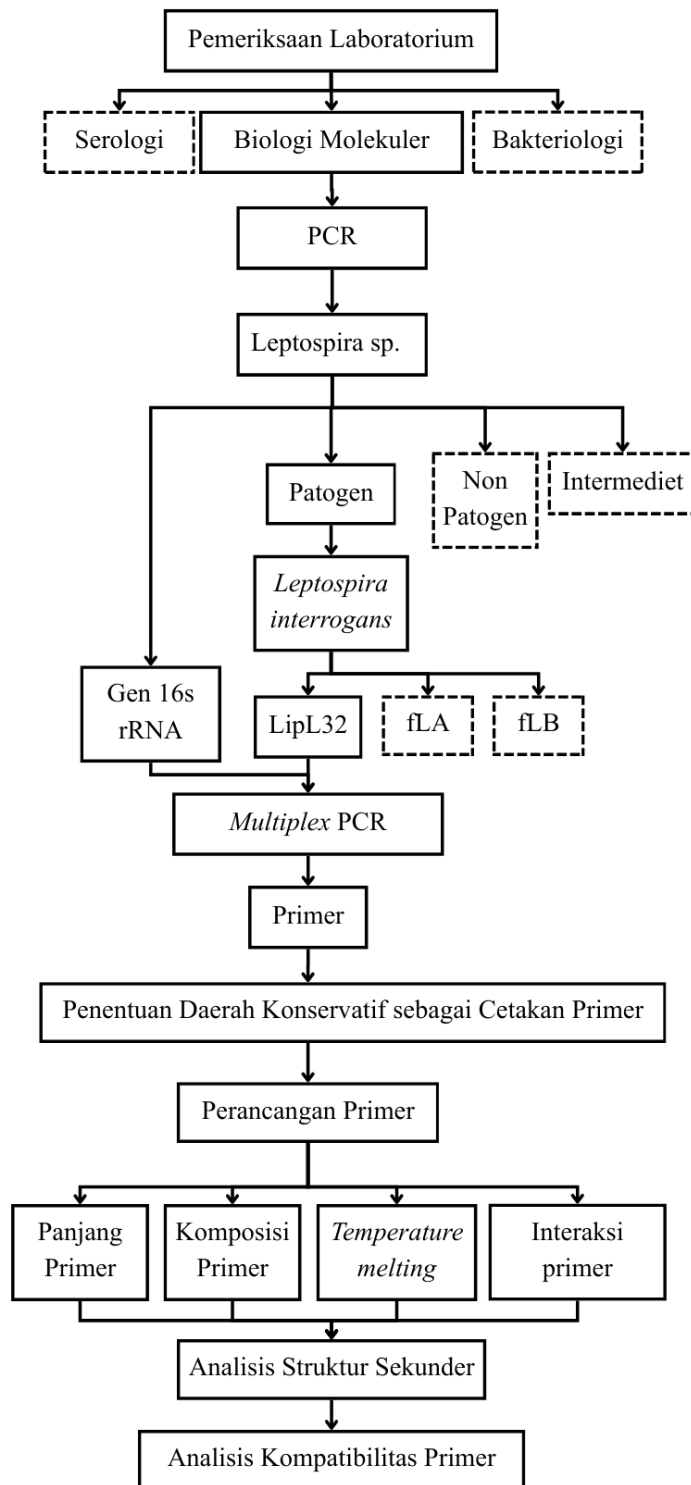
d. Perancangan primer untuk *multiplex* PCR

Metode *Multiplex* PCR menggunakan beberapa primer dalam satu reaksi sehingga harus dipastikan spesifisitas masing-masing primernya supaya mengaplikasikan target yang tepat. Parameter yang harus diperhatikan untuk memastikan spesifisitas dan efisiensi amplifikasi serentak dari beberapa target sekuens dalam satu reaksi terdapat pada tabel berikut :

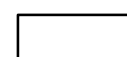
Tabel 5. Parameter yang harus diperhatikan dalam perancangan primer *multiplex* PCR

Parameter	Syarat	Keterangan
<i>PCR product size</i>	Min : 70 bp Max : 200 bp	Panjang produk cukup efisien untuk amplifikasi dan cukup panjang untuk analisis kurva leleh RT-PCR (Rahmawati & Shabrina, 2014).
Panjang primer	18-28 bp	Primer tidak terlalu pendek supaya spesifik pada gen target dan tidak terlalu panjang agar tidak membentuk struktur sekunder dan primer dimer (Rahmawati & Shabrina, 2014).
<i>Primer Melting Temperature (TM)</i>	Min : 55 Opt : 57 Max : 60	Tm primer dari masing-masing serovar diatur dalam suhu yang berbeda untuk memastikan amplifikasi yang spesifik dan optimal sehingga terlihat pola yang berbeda di setiap serovarnya (Rahmawati & Shabrina, 2014).
<i>GC Content</i>	40%-60%	Kandungan GC yang optimal dapat meningkatkan spesifisitas primernya.
Maksimal <i>self-complementarity</i>	8,00	Nilai <i>self-complementarity</i> dijaga untuk mengurangi risiko pembentukan <i>hairpin</i> (Xu dkk., 2023).
Maksimal <i>GC clamp</i>	3	Penambahan parameter ini untuk meningkat efisiensi pengikatan primer ke <i>template</i> (Rahmawati & Shabrina, 2014).
ΔG primer	≥ -7	Semakin negatif nilai ΔG maka semakin tinggi kemungkinan terbentuknya dimer dan <i>overlaps</i> (Rakhmirianti, 2020).

B. Kerangka Teori



Keterangan :



: diteliti

: tidak diteliti

C. Pertanyaan Penelitian

Bagaimana urutan primer yang spesifik untuk amplifikasi gen 16s rRNA dan lipL32 untuk deteksi serovar *L. interrogans* untuk *multiplex* PCR?