



DESAIN PRIMER UNTUK ISOLASI GEN L-LDH BERDASARKAN GENOM *STREPTOCOCCUS PLURANIMALIUM* DAN APLIKASINYA

Daffa Muhammad Rifqi^{1*}, Ixora Sartika Mercuriani¹

¹Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta

*Corresponding author: daffamuhammad.2018@student.uny.ac.id

Abstrak. Asam laktat diketahui merupakan molekul dengan manfaat positif untuk manusia. Molekul tersebut dapat diproduksi oleh bakteri asam laktat. Produksi asam laktat seringkali terganggu karena beberapa spesies bakteri perlu penyesuaian khusus pada substrat, sehingga salah satu solusinya adalah kloning gen atau *over-expression* enzim L-LDH pada bakteri kompeten. Salah satu langkah prosedur tersebut adalah isolasi gen. Desain primer dilakukan menggunakan aplikasi Benchling pada subjek genom *Streptococcus pluranimalium* TH11417 dan seluruh primer diujikan secara *in-silico* menggunakan aplikasi UGENE dan *in-vitro* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Empat pasang primer dihasilkan dengan rincian LSPai 1178, LSPbi 993, LSPad 765, dan LSPbd 846. Primer berhasil menempel dan menghasilkan amplikon yang sesuai pada uji *in-silico* menggunakan templat genom *S. pluranimalium* TH11417, namun hanya LSPai 1178 dan LSPad 765 yang dapat menempel pada templat genom *S. pluranimalium* 14A0014. Primer tidak dapat menempel pada uji *in-vitro* dikarenakan kontaminasi isolat bakteri templat DNA. Kontaminasi dikonfirmasi melalui analisis sekuen 16s rRNA dan didapatkan bahwa amplikon 16s rRNA isolat bakteri uji sesuai dengan sekuen 16s rRNA *Bacillus cereus*. Sekuensing basa amplikon uji *in-vitro* primer LSPai 1178 menunjukkan bahwa amplikon bukan merupakan bagian dari sekuen target.

Kata Kunci: asam laktat, benchling, desain primer, laktat dehidrogenase, PCR *in-silico*

PRIMER DESIGN FOR L-LDH GENE ISOLATION BASED ON *STREPTOCOCCUS PLURANIMALIUM* GENOME AND ITS APPLICATION

Abstract. Lactic acid is known as one of the beneficial molecules for human well-being. Lactic acid bacteria produce lactic acid. Lactic acid production is concomitantly disturbed by the incapability of certain bacteria to adapt to the substrate given. One of the solutions is gene cloning or *over-expression* of L-LDH enzyme in competent bacteria. One of its procedures is gene isolation. The primer design has been done with Benchling software on *Streptococcus pluranimalium* TH11417 with all of the primers designed tested *in-silico* with UGENE software and *in-vitro* with *Polymerase Chain Reaction*. Four primer pairs were generated: LSPai 1178, LSPbi 993, LSPad 765, and LSPbd 846. The primers successfully attached and produced the appropriate amplicons in the *in-silico* assay using *S. pluranimalium* TH11417 template, but only LSPai 1178 and LSPad 765 were able to attach to the *S. pluranimalium* 14A0014 genome. Primers could not adhere to the *in-vitro* test due to contamination of DNA template bacterial isolate. The contamination was confirmed by analysis of the 16s rRNA sequence and it was found that the 16s rRNA amplicon template isolate corresponded to the 16s rRNA sequence of *Bacillus cereus*. Sequencing of LSPai 1178 *in-vitro* test amplicon showed that the amplicon was not part of the target sequence.

Keywords: lactic acid, benching, primer design, lactate dehydrogenase, *in-silico* PCR

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah istilah yang pertama kali dideskripsikan oleh Orla-Jansen pada tahun 1919. Dalam taksonomi, bakteri asam laktat secara luas dapat digolongkan dalam genus *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, dan *Lactococcus* (Wood & Holzapfel, 1995). Bakteri asam laktat merujuk pada beberapa karakteristik unik, yaitu gram positif, tidak berspora, mikroaerofilik, dan karakteristik yang paling utama adalah memiliki produk glikolisis utama berupa asam laktat (Kandler, 1983).

Bakteri ini telah digunakan sebelum bioteknologi modern berkembang dikarenakan aplikasinya yang menguntungkan pada manusia. Pada era bioteknologi tradisional, bakteri ini berperan penting dalam proses regenerasi bahan pangan untuk menimbulkan rasa, konsistensi, dan tampilan luar yang lebih menarik untuk dikonsumsi dan bernilai jual tinggi (Chelule et al., 2010). Penggunaan bakteri asam laktat yang masif sebagai fermentator linear dengan manfaat yang diekstraksikan. Hasil fermentasi yang dihasilkan oleh probiotik asam laktat berguna untuk meningkatkan kesehatan organisme tingkat tinggi. Evivie et al. (2017) dan Choi et al. (2008) telah merangkum berbagai studi tentang efek bakteri asam laktat terhadap beberapa kondisi dan penyakit. Evivie et al. (2017) dan Choi et al. (2008) telah merangkum berbagai studi tentang efek bakteri asam laktat terhadap beberapa kondisi dan penyakit. Asam laktat bekerja pada sistem pencernaan tubuh dengan memberikan suasana asam dan menghalangi pertumbuhan bakteri lain, sehingga patogen tidak dapat tumbuh pada sistem pencernaan. Mekanisme tersebut menyebabkan bakteri asam laktat termasuk dalam kategori probiotik. Keuntungan yang sangat luas ini berakar pada satu karakteristik khas bakteri asam laktat, yaitu metabolisme asam laktat.

Kunci dari keberhasilan metabolisme asam laktat ada pada enzim laktat dehidrogenase. Enzim ini adalah enzim yang krusial pada bakteri asam laktat karena dengan bantuan protein ini, asam laktat yang menguntungkan organisme tingkat tinggi dapat terbentuk. Luaran yang menguntungkan tersebut berbanding terbalik dengan produksi asam laktat yang seringkali mengalami hambatan. Beberapa artikel menyebutkan bahwa hasil ekspresi gen L-LDH/D-LDH pada beberapa spesies bakteri asam laktat menunjukkan luaran yang kurang memuaskan karena kuantitas hasil produksi asam laktat yang sedikit (Abdel-Rahman et al., 2011, 2013; Okano et al., 2010). Permasalahan ini dapat diatasi menggunakan metode *gene knock-out*, gen rekombinan, atau menggunakan campuran dua teknik tersebut.

Teknologi DNA rekombinan adalah teknologi untuk menyalin DNA yang diinginkan dari organisme lain untuk ditambahkan pada organisme yang diinginkan. DNA rekombinan adalah salah satu proses dari *genetic engineering*, yang mana tujuan akhirnya adalah

memodifikasi genom untuk memunculkan sifat pada organisme. Teknologi ini termasuk teknologi yang paling mudah untuk memanipulasi organisme karena teknik yang tidak terlalu rumit (Thieman & Palladino, 2014). Metode ini juga tentunya dapat digunakan untuk memperbanyak hasil asam laktat dengan teknik *over expression*.

Streptococcus pluranimalium adalah bakteri asam laktat yang diidentifikasi pertama kali oleh Devriese et al. (1999). Dalam artikel ilmiah nya, Devriese dkk. Membuktikan bahwa *S. pluranimalium* bereaksi positif pada beberapa uji biokimia, salah satunya positif menghasilkan asam terhadap penggunaan fruktosa, glukosa, dan threalosa. Tsuda & Kodama (2021) mengkonfirmasi bahwa *S. pluranimalium* dapat menghasilkan asam laktat dengan tipe stereoisomer (L). Bukti tersebut kemudian dapat dikonfirmasi oleh hasil pengurutan keseluruhan basa nitrogen (sekuensing) oleh Pan et al. (2018) pada *S. pluranimalium* strain TH11417. Bukti-bukti diatas cukup untuk menyimpulkan bahwa *S. pluranimalium* adalah bakteri yang mampu memproses piruvat menjadi asam laktat, sekaligus mengkonfirmasi keberadaan enzim laktat dehidrogenase. Hal ini menunjukkan bahwa *S. pluranimalium* memiliki gen L-LDH yang berpotensi sebagai kandidat gen donor untuk DNA rekombinan. Namun hingga saat ini, gen L-LDH dari *S. pluranimalium* belum pernah menjadi gen donor untuk rekombinan.

Sejalan dengan penggunaan gen L-LDH dari *S. pluranimalium* sebagai gen donor pada DNA rekombinan, maka diperlukan pula langkah mengisolasi gen enzim L-LDH sebagai bagian dari proses DNA rekombinan. Menurut Wong (2018), gen donor perlu diperbanyak dari kromatin untuk memastikan bahwa terdapat gen donor yang bebas dari kromosom atau DNA sirkular.

Polymerase Chain Reaction atau PCR (Reaksi Polimerik Berantai) adalah suatu prosedur efisien yang dapat memperbanyak satu potongan dari gen yang diinginkan menjadi jutaan hingga miliaran kopi. Reaksi PCR tidak akan berhasil tanpa adanya sepasang primer. Primer adalah untaian oligonukleotida spesifik dengan DNA target yang diinginkan yang akan menempel pada isolat DNA pada tahapan hibridisasi (Berg et al., 2011). Spesifisitas urutan DNA pada setiap spesies menjadi dasar bahwa primer perlu didesain khusus secara spesifik hingga taksonomi spesies agar DNA target yang diinginkan dapat teramplifikasi dengan sempurna.

Laktat dehidrogenase dapat dianggap sebagai enzim yang vital pada bakteri asam laktat, khususnya bakteri homofermentatif, mengingat fungsinya pada sistem metabolisme bakteri sebagai pengkatalisis reaksi fermentasi laktat. Laktat dehidrogenase adalah kunci dari

bioproduk bernilai kesehatan dan ekonomi tinggi yang sering dikonsumsi manusia. Tingginya kebermanfaatan dari Laktat Dehidrogenase adalah alasan yang vital mengapa protein ini penting untuk diproduksi dalam jumlah yang masif dengan teknik DNA rekombinan. Primer spesifik diperlukan untuk mengisolasi gen L-LDH sebagai inisiator elongasi oleh RNA polimerase dalam proses PCR. Hingga saat ini, penggunaan sekuens genom *S. pluranimalium* sebagai bahan acuan desain primer isolasi gen L-LDH belum pernah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui untai oligonukleotida primer untuk isolasi gen L-LDH dan bagaimana penerapannya secara *in-silico* dan *in-vitro*.

METODE

Isolasi DNA dilakukan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Isolation Kit (Geneaid, Taiwan) dan dikerjakan berdasarkan panduan protokol isolasi. Desain primer dilakukan menggunakan perangkat lunak berbasis *Web Benchling*. Primer yang dibuat adalah dua jenis yang berbeda berdasarkan fungsinya. Satu pasang primer digunakan untuk mengisolasi gen, sementara satu pasang primer yang lain sebagai detektor keberadaan gen yang telah diisolasi. Sekuens *Streptococcus pluranimalium* TH11417 sebagai acuan desain primer diambil dari situs NCBI. Kriteria desain primer mengacu pada Sasmito et al. (2014) dan Green & Sambrook (2019). Seluruh primer yang telah didesain dibuat melalui pihak ketiga dan diencerkan berdasarkan panduan pengenceran primer dari pabrikan.

Polymerase Chain Reaction (PCR) secara *in-silico* dilakukan menggunakan perangkat lunak UGENE. Proses PCR *in-silico* dilakukan menggunakan dua templat genom, dimana satu genom adalah templat yang digunakan untuk mendesain primer (*S. pluranimalium* TH11417) dan satu genom yang lain adalah templat yang bukan digunakan sebagai templat mendesain primer (*S. pluranimalium* 14A0014). Setiap genom dilakukan PCR *in-silico* menggunakan primer LSPai 1178 dan LSPbi 993. Pengaturan *mismatch* basa nitrogen diatur tiga pasang basa (Christopherson et al., 1997). Amplikon yang dihasilkan dijadikan sebagai templat untuk konfirmasi gen menggunakan primer deteksi LSPad 765 dan LSPbd 846.

Thermocycler Bio-Rad T100 digunakan untuk isolasi gen L-LDH menggunakan primer yang telah didesain sebagai uji *in-vitro*. Seluruh prosedur dilakukan dalam area steril dan tabung didinginkan menggunakan es. Templat DNA yang digunakan berasal dari isolat bakteri B26. Total volume komponen satu tabung reaksi adalah 25 µl dengan rincian templat DNA bakteri B26 (1µl); primer *forward* dan *reverse* (masing-masing 1 µl); Gotaq Green PCR Ready Mix (12,5 µl); dan ddH₂O (9,5 µl). Program siklus PCR yang digunakan adalah 94°C 60s (denaturasi awal); 94°C 15s (denaturasi); 48,5-57°C 15s (penempelan primer); 72°C 60s

(elongasi); 72°C 5 menit (elongasi akhir); 4°C ∞ (*hold*). Elektroforesis dilakukan setiap uji PCR dengan pengaturan tegangan 80 V selama 38 menit.

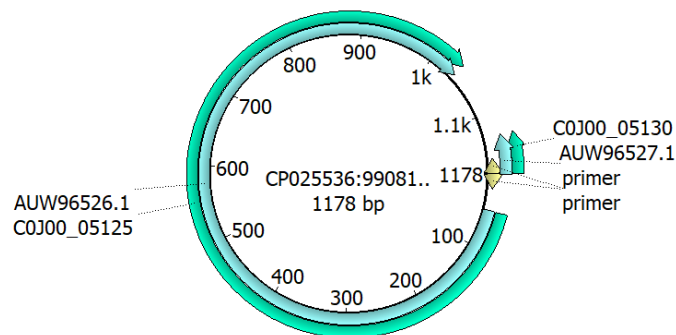
Spesies bakteri B26 dikonfirmasi menggunakan analisis sekuens via metode sekuensing. Klarifikasi sekuens amplicon salah satu hasil isolasi gen dilakukan dengan metode sekuensing. Seluruh metode sekuensing dilakukan melalui pihak ketiga (1st Base melalui PT. Genetika Science).

HASIL DAN PEMBAHASAN

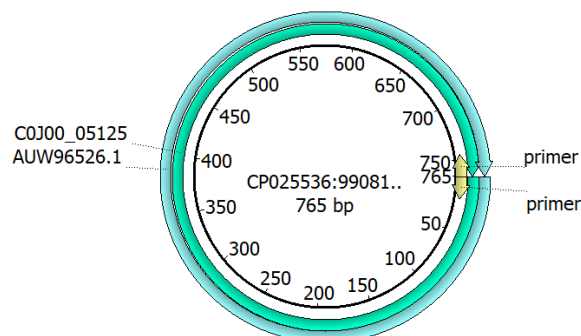
Hasil

Tabel 1. Primer yang telah didesain.

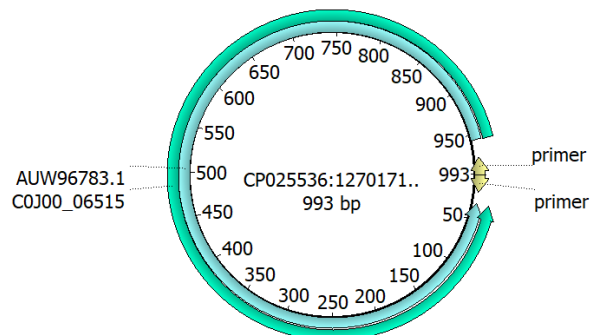
No.	Primer	Oligonukleotida
1.	LSPai 1178 F	5' -CAATTGTATGGGGAAACGCC- 3'
2.	LSPai 1178 R	5' -GGACCTTCTCAACCTGTCAA- 3'
3.	LSPad 765 F	5' -CCAAGGTATCGCTCAAGAAC- 3'
4.	LSPad 765 R	5' -CCAATAACTGCTGGTTGACC- 3'
5.	LSPbi 993 F	5' -CCAATCACAAGGGACTGGC- 3'
6.	LSPbi 993 R	5' -GGAAACAGTCGAGTCGCTC- 3'
7.	LSPbd 846 F	5' -CGCGTTCTTTGATAAGGTTGGC- 3'
8.	LSPbd 846 R	5' -CGCACGGTTTGATTGCTGAG- 3'



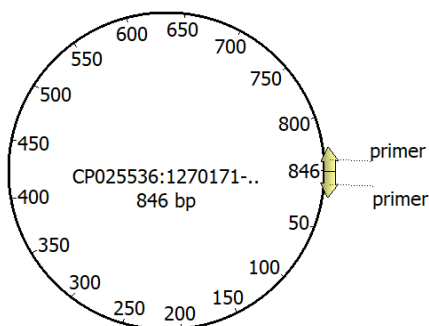
Gambar 1. Hasil PCR *In-Silico* Primer LSPai 1178 pada *S. pluranimalium* TH11417



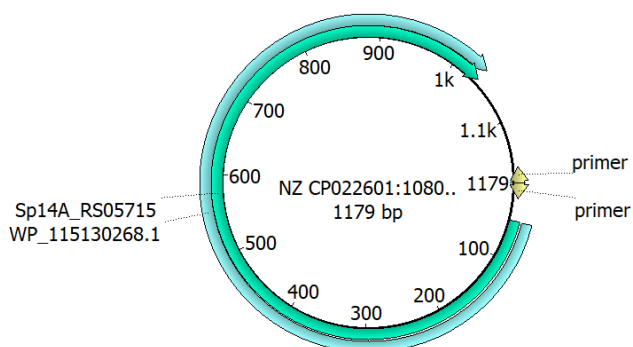
Gambar 2. Hasil PCR *In-Silico* Primer LSPad 765 pada Amplikon Hasil PCR Primer LSPai 1178



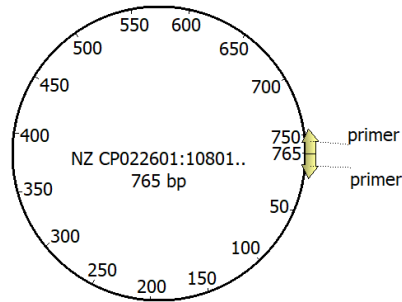
Gambar 3. Hasil PCR *In-Silico* Primer LSPbi 993 pada *S. pluranimalium* TH11417



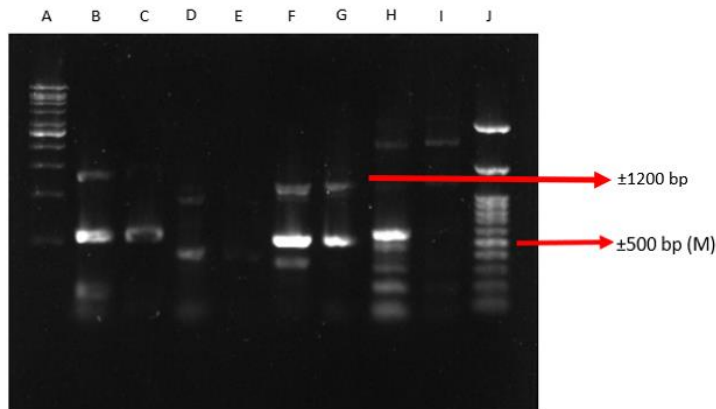
Gambar 4. Hasil PCR *In-Silico* LSPbd 846 pada Amplikon Hasil PCR *In-Silico* Primer LSPbi 993



Gambar 5. Hasil PCR *In-Silico* LSPai 1178 pada *S. pluranimalium* 14A0014



Gambar 6. Hasil PCR *In-Silico* LSPbi 846 pada Amplikon PCR LSPai 1178 *S. pluranimalium* 14A0014

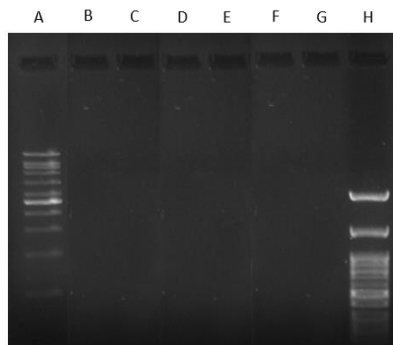


Gambar 7. Hasil Elektroforesis Isolasi DNA L-LDH Menggunakan Primer LSPai 1178 dan LSPbi 993. (A) Penanda 1 Kb; (B) LSPad 50 mM; (C) LSPad 10 mM; (D) LSPbd 50 mM; (E) LSPbd 10 mM; (F) LSPai 50 mM; (G) LSPai 10 mM; (H) LSPbi 50 mM; (I) LSPbi 10 mM; (J) Penanda 1 kbp

Tabel 2. Protokol Touchdown PCR

Tahapan	Suhu	Waktu	Repetisi
Denaturasi Awal	94°C	1 menit	-
Denaturasi	94°C	15 detik	-
Penempelan Primer (1)		15 detik	15x
LSPai	60,9°C		(-1°C setiap siklusnya)
LSPbi	59,4°C		
LSPad	58,5°C		
LSPbd	62,5°C		
Penempelan Primer (2)		15 detik	20x
LSPai	50,9°C		
LSPbi	49,4°C		
LSPad	48,5°C		
LSPbd	52,5°C		

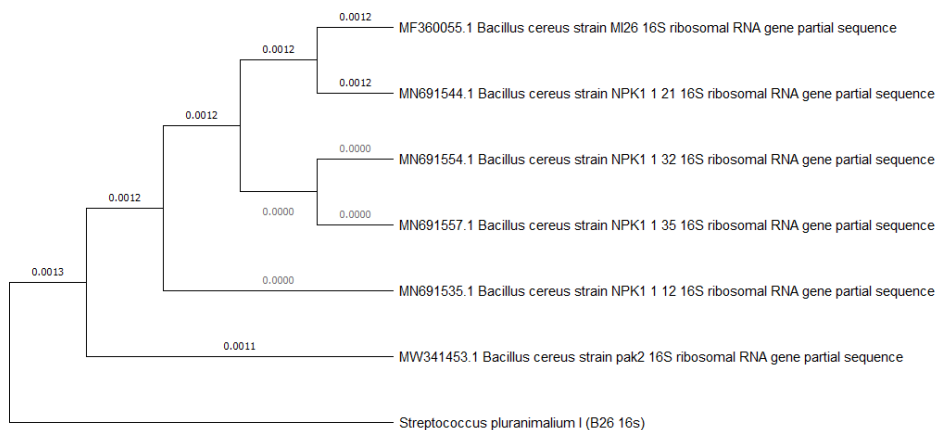
Elongasi	72°C	1 menit	-
Elongasi Akhir	72°C	5 menit	-



Gambar 8. Hasil Elektroforesis Touchdown PCR

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus cereus strain pak2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1590	1590	99%	0.0	99.33%	1267	MW341453.1
Bacillus cereus strain NPK1_1_35_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1587	1587	99%	0.0	99.33%	1279	MN691557.1
Bacillus cereus strain NPK1_1_32_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1587	1587	99%	0.0	99.33%	1244	MN691554.1
Bacillus cereus strain NPK1_1_21_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1587	1587	99%	0.0	99.33%	1224	MN691544.1
Bacillus cereus strain NPK1_1_12_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1585	1585	99%	0.0	99.33%	1262	MN691535.1
Bacillus cereus strain MI26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1585	1585	99%	0.0	99.33%	951	MF360055.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Z93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	1583	1583	99%	0.0	99.33%	1441	MW559474.1
Bacillus cereus strain NIBSM_OsR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1581	1581	99%	0.0	99.33%	1498	KY930702.1
Bacillus sp. G1C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. G1C	1581	1581	99%	0.0	99.33%	1375	KJ849835.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	1581	1581	99%	0.0	99.33%	1475	MW063457.1
Bacillus cereus strain 2M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1580	1580	98%	0.0	99.33%	920	MT422111.1
Bacillus cereus strain WHX1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1580	1580	98%	0.0	99.33%	1444	MN216227.1

Gambar 9. Hasil BLAST Konsensus 16s rRNA Bakteri B26



Gambar 10. Kladogram Filogenetik Sekuens Hasil Sekuensing 16s rRNA Isolat Bakteri dan Enam Sekuens DNA Hasil Uji BLAST.

	BC pak2	SP B26	BC MI26	BC NPK1_1_12	BC NPK1_1_21	BC NPK1_1_32	BC NPK1_1_35
BC pak2		0,0078521593	0,0044801378	0,0022361640	0,0033584032	0,0033584032	0,0033584032
SP B26	0,007852159		0,0089784430	0,0078579406	0,0089784430	0,0078521593	0,0078521593
BC MI26	0,004480138	0,0089784430		0,0033608681	0,0022378028	0,0022378028	0,0022378028
BC NPK1_1_12	0,002236164	0,0078579406	0,0033608681		0,0033608681	0,0011175172	0,0011175172
BC NPK1_1_21	0,003358403	0,0089784430	0,0022378028	0,0033608681		0,0022378028	0,0022378028
BC NPK1_1_32	0,003358403	0,0078521593	0,0022378028	0,0011175172	0,0022378028		0,0000000000
BC NPK1_1_35	0,003358403	0,0078521593	0,0022378028	0,0011175172	0,0022378028	0,0000000000	

Gambar 12. Hasil Analisis Jarak Perbedaan Genetik Hasil Sekuensing 16s rRNA Isolat Bakteri dan Enam Sekuens DNA Hasil Uji BLAST

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HER1410 chromosome, complete genome	Bacillus thuringi...	610	610	79%	1e-170	96.48%	5585577	CP050183.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BT62 chromosome, complete genome	Bacillus thuringi...	610	610	79%	1e-170	96.48%	5294964	CP044978.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. SH8-8 chromosome, complete genome	Bacillus sp. SH8-8	610	610	79%	1e-170	96.48%	5241886	CP031065.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. AR4-2 chromosome, complete genome	Bacillus sp. AR4-2	610	610	79%	1e-170	96.48%	5241257	CP031062.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain 09 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	610	610	79%	1e-170	96.48%	5250357	CP042874.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain FORC60 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	610	610	79%	1e-170	96.48%	5361178	CP020383.1

Gambar 11. Enam Hasil Uji BLAST pada Sekuens *Forward* Hasil PCR LSPai 1178

Pembahasan

Primer hasil eksplorasi dirinci pada tabel 1. Proses eksplorasi primer menunjukkan bahwa terdapat dua gen L-LDH pada genom *S. pluranimalium* TH11417. Gen L-LDH terletak pada lokus COJ00_05125 dan COJ00_06515. Primer yang dilambangkan dengan huruf A menandakan bekerja pada lokus COJ00_05125, sedangkan huruf B menandakan primer bekerja pada lokus COJ00_06515. Primer dengan huruf akhir I menandakan primer berfungsi sebagai isolator gen dan primer dengan huruf akhir D menandakan fungsi primer sebagai isolator.

Seluruh primer telah melalui serangkaian pengecekan kriteria dan beberapa primer telah memenuhi kriteria yang disusun oleh Sasmito, dkk (2014) dan Green & Sambrook (2019). Primer yang tidak memenuhi kriteria adalah primer LSPai 1178 dengan anomali terdapat urutan basa 5'-GGGGAAA-3' yang merupakan dua sekuen repetitive. Green & Sambrook (2019) menjelaskan bahwa sekuen repetitif lebih dari tiga pasang basa perlu dihindari agar tidak timbul struktur *hairpin*. Sekuen repetitif juga dapat menyebabkan ampikon ganda karena banyak tersebarannya sekuen repetitive pada genom, khususnya poly (A) dan poly (T) (Apte & Daniel, 2009). Kendala dalam desain primer LSPai 1178 F adalah banyaknya wilayah basa repetitif pada wilayah sebelum kodon mulai. Hal ini menjadikan sekuen repetitif tidak dapat dihindari, namun dapat diminimalisir. Oligonukleotida LSPai 1178 F tetap dipilih dengan alasan nilai energi bebas gibbs yang masih memenuhi standar (ΔG -6.3 kcal/mol). Hal ini menandakan bahwa struktur sekunder masih dapat terkontrol. Lorenz (2012) berpendapat bahwa apabila sekuen repetitive tidak dapat dihindari, maka batas maksimal yang diperbolehkan adalah empat basa nitrogen. Basa nitrogen repetitive yang lebih dari empat memperbesar resiko ampikon

tidak sesuai.

Primer LSPai 1178 R terletak pada basa 991971-991990 dan telah memenuhi kriteria desain primer. Primer ini berpasangan dengan LSPai 1178 F. Primer ini terletak pada wilayah gen C0J00_5130. Meskipun primer terletak pada wilayah gen lain, basa yang terambil tidak berpengaruh terhadap transkripsi apabila ampikon akan digunakan sebagai gen target untuk kloning dan gen target masih dapat teramplifikasi secara komplit pada PCR.

Anomali karakteristik LSPai 1178 juga timbul pada suhu leleh. Suhu leleh pada LSPai 1178 F adalah 53,9°C sedangkan pada LSPai 1178 R adalah 53,3°C. Angka ini lebih rendah daripada suhu yang direkomendasikan. Penambahan beberapa basa terdekat untuk dimasukkan ke dalam bagian primer seperti LSPai R/F menimbulkan konsekuensi yaitu naiknya nilai ΔG menjadi 8.9-9 kcal/mol. Nilai ini berdampak langsung kepada resiko kemunculan struktur sekunder primer yang tinggi. Sementara itu, eksplorasi oligonukleotida menunjukkan bahwa tidak memungkinkan untuk memilih oligonukleotida pada region yang lain. Faktor yang mempengaruhi adalah wilayah sekuen yang kaya akan adenin dan timin repetitif yang nantinya juga berdampak pada struktur sekunder primer (Rajewska et al., 2012).

Seluruh primer kemudian diuji menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *in-silico* sebelum diuji *in-vitro*. Hasil uji *in-silico* primer dicantumkan pada gambar 1-6. Uji *in-silico* dilakukan pada dua genom bakteri *S. pluranimalium* dengan strain TH11417 dan 14A0014. Pemilihan dua genom bakteri dipertimbangkan untuk objektivitas uji. Genom *S. pluranimalium* TH11417 adalah genom yang digunakan sebagai cetakan primer, sedangkan genom strain yang lain digunakan sebagai uji validasi apakah primer dapat menempel pada strain yang lain mengingat analisis tingkat molekular memerlukan akurasi yang tinggi. Templat didapatkan dari bank genom NCBI dengan kode akses CP025536 untuk *S. pluranimalium* strain TH11417 dan CP022601 untuk *S. pluranimalium* strain 14A0014. Seluruh pengaturan *mismatch base* pada *in-silico* PCR diatur pada tiga basa. Pengaturan ini disesuaikan dengan kondisi *in-vitro* PCR dimana seluruh basa pada primer tidak perlu untuk sepenuhnya komplemen pada primer agar elongasi dapat dimulai (Clark & Pazdernik, 2013).

Hasil dari analisis PCR *in-silico* pada genom *S. pluranimalium* TH11417 menunjukkan bahwa seluruh primer isolasi dapat menempel dengan akurat pada genom. Seluruh primer deteksi juga dapat menempel dengan akurat pada templat hasil PCR *in-silico* menggunakan primer isolasi.

PCR *in-silico* pada genom *S. pluranimalium* TH11417 menggunakan primer LSPai 1178 menunjukkan hasil sekuen sama persis dengan sekuen target, yaitu 1178 basa nitrogen. Ampikon juga menunjukkan bahwa gen yang dihasilkan adalah gen pada lokus C0J00_05125.

Sementara itu, primer deteksi LSPad 765 dapat menempel dengan akurat pada templat hasil PCR *in-silico* menggunakan primer LSPai 1178 dengan hasil 765 basa. Hasil PCR *in-silico* *S. pluranimalium* TH11417 menggunakan LSPai 1178 dan LSPad 765 disajikan dalam bentuk DNA sirkular pada Gambar 1 dan 2.

PCR *in-silico* pada genom *S. pluranimalium* TH11417 menggunakan primer LSPbi 993 menunjukkan hasil penempelan primer yang akurat dan amplikon yang tepat, yaitu sebesar 993 pasang basa. Hasil PCR *in-silico* mengkonfirmasi bahwa amplikon yang dihasilkan adalah L-LDH lokus C0J00_06515. Deteksi sekuen L-LDH menggunakan primer LSPbd 846 pada templat hasil PCR *in-silico* menggunakan primer LSPbi 993 menunjukkan bahwa amplikon yang dihasilkan menunjukkan hasil 846 pasang basa. Hasil PCR *in-silico* primer LSPbi 993 dan LSPbi 846 pada *S. pluranimalium* TH11417 disajikan dalam bentuk DNA sirkular pada Gambar 3 dan 4.

Primer LSPai 1178 diujikan pada templat genom *S. pluranimalium* 14A0014 menggunakan PCR *in-silico*. Primer ini dapat menempel dengan akurat pada genom ditunjukkan dengan amplikon yang ditampilkan sebagai DNA sirkular pada gambar 5. Hasil PCR *in-silico* terletak pada basa 1080168-1081346. Primer LSPai 1178 mengamplifikasi 1179 pasang basa pada lokus Sp14A_11920 dan dikonfirmasi melalui anotasi bahwa lokus ini mengkodekan gen L-Laktat Dehidrogenase. Primer LSPad 765 dapat melakukan deteksi LDH menggunakan hasil PCR *in-silico* LSPai 1178 pada genom *S. pluranimalium* 14A0014 dengan akurat. Hasil PCR *in-silico* yang dihasilkan adalah 765 pasang basa pada posisi 1080300-1081196.

Kesuksesan penempelan primer LSPai 1178 pada *S. pluranimalium* 14A0014 yang akurat pada genom tidak dibersamai dengan primer LSPbi 993. Primer ini gagal menempel pada genom *S. pluranimalium* 14A0014. Analisis yang dilakukan pada anotasi genom mengungkapkan bahwa hanya terdapat satu lokus gen L-LDH pada *S. pluranimalium* 14A0014. Lokus tersebut telah teramplifikasi menggunakan primer LSPai 1178. Fakta ini menunjukkan bahwa gagalnya penempelan LSPbi 993 menjadi rasional karena ketidakhadiran gen L-LDH yang ditargetkan.

Primer yang telah diuji secara *in-silico* dilanjutkan untuk proses isolasi gen L-LDH menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Metode PCR adalah metode amplifikasi region DNA secara *in-vitro* yang dipicu menggunakan suhu berdasarkan prinsip replikasi DNA *in-vivo* (Schleif & Wensink, 1981).

Hasil elektroforesis pada percobaan isolasi gen LDH menunjukkan bahwa terdapat pita

tebal berukuran ± 500 bp yang terlihat pada primer LSPad 746 50 mM, LSPai 50 mM, LSPai 10 mM, dan LSPbi 50 mM (Gambar 7). Meskipun terdapat pita yang tebal, yang mana menunjukkan bahwa terdapat amplikon yang secara masif terbentuk (Aaij & Borst, 1972), ukuran pita tersebut tidak menunjukkan region DNA yang seharusnya teramplifikasi. Primer masih menempel pada fragmen DNA yang tidak tepat. Beberapa pita lain selain pita tebal yang terdeteksi juga terlihat di primer LSPad 746 50 mM, LSPai 1178 50 mM, LSPai 1178 10 mM, dan LSPbi 993 50 mM. Pita yang dihasilkan pada hasil PCR LSPai 1178 50 mM dan 10 mM menunjukkan pendarahan pita lemah sebesar ± 1200 bp. Hasil ini mungkin menunjukkan amplikon yang ditargetkan, namun pita yang dihasilkan sangat lemah dan beberapa pita lain terdeteksi. Hasil ini menunjukkan bahwa mayoritas primer yang didesain masih menempel pada region DNA yang tidak tepat sasaran.

Kesalahan penempelan primer dapat diatasi dengan modifikasi teknik PCR. Salah satu teknik PCR yang dapat meningkatkan akurasi penempelan adalah *Touchdown* PCR. *Touchdown* PCR (TD-PCR) adalah suatu teknik modifikasi suhu penempelan dimana suhu akan diatur $10-15^{\circ}\text{C}$ lebih tinggi daripada suhu leleh primer dengan pengurangan suhu 1°C setiap siklusnya hingga $2-5^{\circ}\text{C}$ lebih rendah dari suhu leleh untuk tujuan mengurangi kesalahan penempelan primer. Proses PCR dilanjutkan dengan suhu penempelan primer optimal dan repetisi 15-20X tanpa penurunan suhu (Green & Sambrook, 2018; Korbie & Mattick, 2008).

TD-PCR dilakukan pada primer LSPai 1178 50 mM dan 10 mM, LSPbi 993 50 mM dan 10 mM, LSPad 765, dan LSPbd 846. Komposisi dan kuantitas PCR yang digunakan sama dengan PCR pada tahap pertama dengan penggantian mastermix menjadi MyTaqTM HS Red Mix.

Hasil elektroforesis (Gambar 9) menunjukkan bahwa tidak ada pita yang terdeteksi dari seluruh hasil TD-PCR. Menurut Roux (2009) dan Schrick & Nitsche (2016), penyebab paling umum PCR tidak menampakkan hasil pada elektroforesis adalah kesalahan pada reagen. Seluruh percobaan *in-vitro* terhadap primer LSPai 1178, LSPbi 993, LSPad, dan LSPbd 846 telah dilakukan dan seluruhnya tidak membuahkan hasil sesuai dengan target. Kesalahan yang paling mungkin terjadi terletak pada DNA templat. *Streptococcus pluranimalium* B26 adalah strain bakteri yang didapatkan dari ayam betina dan telah melalui proses kultur ulang berkali-kali, mengingat penelitian ini termasuk dalam penelitian konsorsium. Bakteri-bakteri lain bersandingan dengan *Streptococcus pluranimalium* pada proses kultur ulang, sehingga kemungkinan kontaminasi oleh bakteri lain sangat besar.

Analisis kemiripan sekuens BLAST konsensus hasil sekuensing DNA penyandi 16s rRNA pada bakteri *S. pluranimalium* B26 menunjukkan bahwa bakteri tidak menunjukkan kekerabatan

dengan DNA molekul 16s rRNA *Streptococcus pluranimalium*, melainkan dengan DNA molekul 16s rRNA *Bacillus cereus*. Kekekabatan 16s rRNA B26 dengan 16s rRNA milik *Bacillus cereus* memiliki persen identik 99.11%-99.33% yang mana menunjukkan bahwa bakteri yang sebelumnya dideteksi *Streptococcus pluranimalium*, setelah dianalisis ulang menunjukkan spesies bakteri yang berbeda, yaitu *Bacillus cereus*. Angka persen identik >99% menunjukkan bahwa isolat dapat dianalisis hingga tingkat spesies dengan akurat.

Kladogram hasil analisis kekekabatan filogenetik menunjukkan bahwa sekuens 16s rRNA isolate *Streptococcus pluranimalium* memiliki jarak kekekabatan yang berbeda jauh dengan seluruh sekuens hasil BLAST. Kladogram menunjukkan bahwa sekuens *Streptococcus pluranimalium* B26 memiliki percabangan yang berbeda dengan seluruh sekuens hasil BLAST. Hal ini menandakan bahwa seluruh sekuens hasil BLAST memiliki mayoritas DNA yang juga dimiliki oleh sekuens *Streptococcus pluranimalium* B26, namun sekuens *Streptococcus pluranimalium* B26 tidak memiliki karakter DNA yang dimiliki oleh sekuens hasil BLAST.

Representasi uji jarak genetik menunjukkan bahwa perbedaan seluruh sekuens terhadap setiap sekuens berada pada angka <1%. Bukti ini berbeda dengan analisis kladogram yang menunjukkan bahwa sekuens 16s rRNA bakteri B26 berkekabatan jauh dengan sekuens 16s rRNA bakteri *Bacillus cereus* hasil BLAST. Pada analisis kladogram ditunjukkan bahwa memang sekuens 16s rRNA bakteri B26 berkekabatan jauh dengan sekuens 16s rRNA bakteri *Bacillus cereus* hasil BLAST, namun perbedaan tersebut masih dalam rentang angka <1% yang mana masih menunjukkan bahwa isolat bakteri B26 terkonfirmasi sebagai *Bacillus cereus* berdasarkan analisis sekuens 16s rRNA.

Sekuensing yang dilakukan pada hasil PCR LSPai 1178 menunjukkan bahwa basa hasil sekuensing pada sekuens *reverse* tidak bisa dibaca dengan jelas dengan adanya banyak *noise peak* pada kromatogram (Gambar 17). Penyebab paling kuat yang mungkin melatarbelakangi kegagalan pembacaan tersebut adalah adanya ampikon pada region lain pada hasil PCR. Hasil elektroforesis memang menunjukkan bahwa pita yang terbentuk adalah tunggal, namun kemungkinan tetap ada beberapa untai DNA hasil amplifikasi dari region DNA lain. Region DNA yang lebih dari satu ini dapat mengganggu reaksi sekuensing karena penempelan primer yang mungkin menempel pada lebih dari satu untai pada satu reaksi (Crossley et al., 2020; Varma & Oulemuller, 2007).

Hasil sekuensing untai *forward* pada sampel hasil PCR LSPai 1178 memiliki *noise* yang cukup banyak, namun *noise* masih dapat diperbaiki dengan delesi basa manual pada beberapa *double peak* (Crossley et al., 2020). Hasil verifikasi melalui uji BLAST yang

menggunakan untai forward saja tanpa menggunakan untai reverse menunjukkan bahwa hasil PCR LSPai 1178 memiliki similaritas 96.48% pada salah satu gen bakteri *Bacillus thuringiensis* HER1410, *Bacillus thuringiensis* BT62, *Bacillus sp.* SH8-8, *Bacillus sp.* AR4-2, *Bacillus cereus* 09, dan *Bacillus cereus* FORC60. Produk gen yang relevan dengan sekuens forward amplicon PCR LSPai 1178 adalah *transcription regulator* dan *NUDIX domain-containing protein*.

Produk protein hasil uji BLAST pada sekuens forward hasil PCR LSPai 1178 menunjukkan bahwa basa produk sekuensing tidak menunjukkan produk DNA yang diinginkan. Hal ini diperkuat dengan hasil sekuensing DNA 16s rRNA yang menunjukkan bahwa isolat bakteri yang digunakan bukan bakteri *Streptococcus pluranimalium*, melainkan bakteri *Bacillus cereus*. Penggunaan isolat DNA PCR yang berbeda dengan DNA templat pembuatan primer akan menghasilkan produk yang berbeda pula, mengingat DNA suatu organisme unik hingga tingkat spesies. Penggunaan templat DNA yang berbeda dengan primer menghasilkan basa yang tidak sesuai dengan apa yang primer seharusnya isolasi. Reaksi ini secara otomatis menghasilkan produk PCR yang berbeda karena primer tidak akan menempel pada sekuens yang sesuai.

SIMPULAN

Delapan untai primer telah dibuat dengan fungsi isolasi dan deteksi gen. Primer telah diujikan melalui uji *in-silico* dan uji *in-vitro*. Primer LSPai 1178, LSPad 765 dapat menempel pada genom *S. pluranimalium* 14A0014, sementara seluruh primer dapat menempel pada genom *S. pluranimalium* TH11417. Uji *in-vitro* menunjukkan bahwa primer gagal menempel pada sekuens target karena spesies bakteri yang digunakan terkontaminasi oleh bakteri lain. Primer dapat digunakan untuk isolasi gen dalam prosedur gen kloning atau *over-expression* apabila genom bakteri adalah genom yang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 269(2), 192-200. doi: 10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156, 286-301. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.017.
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31, 877-902. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3, 1-11. doi: 10.1101/pdb.ip65.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2011). *Biochemistry (7th Edition)*. London: Palgrave Macmillan.
- Chelule, P.K., Mokoena, M.P., & Gqaleni, N. (2010). Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. *Current Research, Technology, and Education Research in Applied Microbiology and Microbial Technology*, 1160-1167.
- Choi, M.S., Jung, U.J., Yeo, J., Kim, M.J., & Lee, M.K. (2008). Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 24(1), 74-81. doi: 10.1002/dmrr.780.
- Christopherson, C., Sninsky, J., & Kwok, S. (1997). The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 654-658. doi: 10.1093/nar/25.3.654.
- Clark, D.P., & Pazdernik, N.J. (2013). *Molecular biology second edition*. Massachusetts: Elsevier.
- Crossley, B.M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M.L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767-775. doi: 10.1177/1040638720905833.
- Devriese, L.A., Vandamme, P., Collins, M.D., Alvarez, N., Pot, B., Hommez, J., Butaye, P., & Haesebrouck, F. (1999). *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1221-1226. doi: 10.1099/00207713-49-3-1221.
- Evivie, S.E., Huo, G.C., Igene, J.O., & Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food and Nutrition Research*, 61(1), 1-16. doi: 10.1080/16546628.2017.1318034.
- Green, M.R., & Sambrook, J. (2018). Touchdown polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 5, 350-353. doi: 10.1101/pdb.prot095133.
- Green, M.R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6, 436-456. doi: 10.1101/pdb.top095109.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224. doi: 10.1007/BF00399499.
- Korbie, D.J., & Mattick, J.S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63(3998), 1-15. doi: 10.3791/3998.

- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 413-423. doi: 10.1007/s00253-009-2280-5.
- Pan, Y., An, H., Fu, T., Zhao, S., Zhang, C., Xiao, G., Zhang, J., Zhao, X., & Hu, G. (2018). Characterization of *Streptococcus pluranimalium* from a cattle with mastitis by whole genome sequencing and functional validation. *BMC Microbiology*, 18(182), 1-9. doi: 10.1186/s12866-018-1327-0.
- Rajewska, M., Wegrzyn, K., & Konieczny, I. (2012). AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol. Rev*, 36(2), 408-434. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00300.x.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(4), 1-6. doi: 10.1101/pdb.ip66.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014, 6 Desember 2014). *Karakteristik primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: Mini review*. Paper presented at the Seminar Nasional Informatika Medis in Magister Teknik Informatika, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Islam Indonesia. From https://journal.uii.ac.id/snimed/article/view/6329/_10.
- Schleif, R.F., & Wensink, P.C. (1981). *Practical methods in molecular biology*. New York: Springer-Verlag.
- Schrick, L., & Nitsche, A. (2016). Pitfalls in PCR troubleshooting: Expect the unexpected?. *Biomolecular Detection and Quantification*, 6, 1-3. doi: 10.1016/j.bdq.2015.11.001.
- Thieman, W.J., & Palladino, M.A. (2014). *Introduction to biotechnology (2nd ed.)*. San Francisco: Pearson Education.
- Tsuda, H., & Kodama, K. (2021). Evaluating the technological properties of lactic acid bacteria in Wagyu cattle milk. *Journal of Dairy Research*, 88(2), 210-216. doi: 10.1017/S0022029921000339.
- Varma, A., & Oelmuller, R. (2007). *Advanced techniques in soil microbiology*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Wong, D.W.S. (2018). *The ABCs of gene cloning (third edition)*. New York: Springer International Publishing.
- Wood, B.J.B., & Holzapel, W.H. (1995). *The genera of lactic acid bacteria*. London: Springer Science+Business Media, B.V.