

Desain Primer Gen *dapD* dari Bakteri *Escherichia coli* untuk Seleksi Bebas Antibiotik

Primer Design of *dapD* Gene from the *Escherichia coli* for Selection of Antibiotic-Free

Zulhaerana Bahar

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia
Email Korespondensi: zulhaeranabahar@farmasi.unmul.ac.id

Abstrak

Gen *dapD* mengkode enzim DapD yang berperan pada jalur biosintesis lisin, dimana delesi dan mutasi dari gen ini bersifat letal bagi bakteri sehingga dapat digunakan untuk sistem seleksi bebas antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer gen *dapD* yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen tersebut pada *Escherichia coli* sehingga dapat digunakan untuk deteksi dan konfirmasi pada pengembangan sistem seleksi transforman bebas antibiotik. Desain primer dilakukan secara *in silico* menggunakan program NCBI Primer Blast. Sekuens gen *dapD* diperoleh dari GenBank NCBI (NC_002695.2). Penelitian ini telah berhasil memperoleh sekuen sepasang primer (*forward* dan *reverse*) dengan panjang masing-masing adalah 20 oligonukleotida; T_m primer *forward* 59,97°C dan primer *reverse* 59,83°C; %GC 50; dimer pada ujung 3' primer *forward* 0 dan primer *reverse* 2; dan *self-complementary* 4. Gen *dapD* dengan ukuran ± 800 pb berhasil diamplifikasi pada teknik PCR dan dikonfirmasi menggunakan elektroforesis agarosa 1%.

Kata Kunci: primer, PCR, *dapD*, *Escherichia coli*, sistem seleksi bebas antibiotik

Abstract

The *dapD* gene codes for the DapD enzyme, which plays a role in the lysine biosynthesis pathway, where deletion and mutation of this gene is lethal for bacteria, so it can be used for an antibiotic-free selection system. This research aims to design primers for the *dapD* gene that can amplify this gene in *Escherichia coli* for detection and confirmation in developing an antibiotic-free transformant selection system. Primer design was carried out *in silico* using the NCBI Primer Blast program. The *dapD* gene sequence was obtained from NCBI GenBank (NC_002695.2). This research has succeeded in obtaining the sequence of a pair of primers (*forward* and *reverse*) with a length of 20 oligonucleotides each; T_m of forward primer 59.97°C and reverse primer 59.83°C; %GC 50; dimer at the 3' end of forward primer

0 and reverse primer 2; and self-complementary 4. The *dapD* gene with a size of \pm 800 bp was successfully amplified using the PCR technique and confirmed using 1% agarose electrophoresis.

Keywords: primer, PCR, *dapD*, *Escherichia coli*, antibiotic-free selection system

Diterima: 11 Desember 2023

Disetujui: 29 Februari 2024

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i1.2164>



Copyright (c) 2024, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.).
Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia.
This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

Cara Sitasi:

Bahar, Z., 2024. Desain Primer Gen *dapD* dari Bakteri *Escherichia coli* untuk Seleksi Bebas Antibiotik *J. Sains Kes.*, 6(1). 158-163. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i1.2164>

1 Pendahuluan

Keberhasilan transformasi vektor plasmid ke dalam sel dikonfirmasi melalui seleksi transforman. Sistem seleksi transforman terdiri dari dua jenis yaitu sistem seleksi berbasis antibiotik dan sistem seleksi bebas antibiotik. Sistem seleksi berbasis antibiotik banyak digunakan karena mudah dilakukan. Namun, pedoman WHO, FDA, dan EMA menyatakan bahwa penggunaan antibiotik untuk seleksi transforman sebaiknya dihindari karena dapat meningkatkan risiko penyebaran resistensi antibiotik dan berpotensi menimbulkan reaksi hipersensitif pada pasien untuk antibiotik golongan beta laktam. Oleh karena itu, terdapat beberapa sistem seleksi bebas antibiotik yang dikembangkan antara lain sistem seleksi auksotrof [1].

Sistem seleksi auksotrof adalah sistem seleksi yang memanfaatkan ketidakmampuan sel inang untuk memproduksi senyawa organik yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Sel inang yang digunakan telah dimodifikasi dengan menghilangkan atau memutasi gen esensial tertentu dalam kromosom sehingga sel tersebut tidak mampu memproduksi senyawa esensial terkait untuk pertumbuhan. Salah satu keuntungan menggunakan sistem seleksi

auksotrof pada produksi protein rekombinan adalah sistem ini bersifat lebih stabil dan aman dalam proses seleksi transforman [2].

Gen *dapD* merupakan suatu gen dalam kromosom *E. coli* yang mengkode enzim tetrahidrodipikolinat N-suksiniltransferase (DapD). Enzim DapD mengkatalisis perubahan tetrahidrodipikolinat (THDPA) menjadi N-asil-L-2-amino-6-oksopimelat pada jalur biosintesis lisin seperti yang terlihat. Bagi bakteri, lisin merupakan asam amino penting untuk pembentukan protein dan pertumbuhan. Selain itu, senyawa intermediet yang terbentuk pada jalur biosintesis lisin sekaligus sebagai prekursor langsung lisin, m-DAP, merupakan komponen penyusun peptidoglikan. Tidak terbentuknya senyawa m-DAP atau lisin akan menghambat pembentukan dinding sel bakteri sehingga bakteri tidak mampu menahan tekanan osmotik lingkungan yang mengarah pada lisis dan kematian sel [3]. Delesi atau mutasi gen *dapD* sebagai pengkode enzim DapD yang terlibat dalam jalur biosintesis lisin bersifat letal bagi bakteri. Oleh karena itu, gen *dapD* dapat digunakan dalam sistem seleksi auksotrof [4,5].

PCR adalah metode amplifikasi DNA secara *in vitro* yang terjadi dalam beberapa siklus

untuk menduplikasi jumlah DNA target spesifik. Reaksi PCR diinisiasi oleh pelekatan primer pada DNA target, kemudian terjadi pemanjangan oleh enzim DNA polimerase dengan penambahan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam mesin *thermal cycler*. Komponen reaksi PCR antara lain: DNA target/*template*, sepasang primer, dNTPs (Deoxynucleotide trifosfat); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl₂) dan enzim DNA polimerase. Rancangan suatu primer merupakan salah satu parameter penentu keberhasilan suatu proses PCR. Primer adalah oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA *template*, berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang untuk proses eksistensi DNA [6–9].

Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mendesain sistem seleksi berbasis non-antibiotik sebelum dilakukan mutasi gen *dapD* pada *Escherichia coli*. Penelitian ini secara spesifik bertujuan untuk mendapatkan desain primer yang baik secara *in silico* sehingga dapat digunakan untuk deteksi maupun konfirmasi gen *dapD*.

2 Metode Penelitian

2.1 Desain primer gen *dapD* *Escherichia coli*

Sekuen gen *dapD* *Escherichia coli* (Gen ID: NC_002695.2) diperoleh dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov digunakan sebagai *template* dalam mendesain sepasang primer. Primer didesain dengan cara memasukkan sekuens FASTA gen *dapD* (Gambar 1) pada kotak dialog yang ada pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/. Dipilih rentang ukuran produk 100–1000 bp dan perbedaan T_m tidak lebih dari 2°C.

2.2 Amplifikasi Fragmen Gen *dapD* dengan Teknik PCR

PCR dilakukan dengan DreamTaq Green PCR Master Mix 2×. Komposisi reaksi PCR yang digunakan adalah 1 µL kromosom *Escherichia coli*, 12,5 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (2×), masing-masing 1 µL For-*dap-NotI* dan Rev-*dap-NotI*, dan ddH₂O hingga volume akhir 25 µL. Kondisi PCR hasil optimasi adalah tahap denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit,

tahap amplifikasi sebanyak 30 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit, dan tahap pemanjangan DNA pada 72°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan pemanjangan akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR selanjutnya dikonfirmasi kebenaran ukuran dan ditentukan konsentrasinya dengan elektroforesis gel agarosa 1% pada 80 V selama 60 menit.

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Desain primer gen *dapD* *Escherichia coli*

Keberhasilan reaksi PCR salah satunya bergantung dari perancangan primer, karena sensitifitas dan spesifisitas PCR sangat dipengaruhi oleh primer. Rancangan primer yang kurang baik akan menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik dan sistem PCR yang tidak efektif. Perancangan primer dapat dilakukan secara *in silico* menggunakan aplikasi ataupun website seperti “NCBI Primer Blast” untuk memperoleh primer yang memenuhi kriteria primer yang baik [10].

```

Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome
NCBI Reference Sequence: NC_002695.2
GenBank Graphics
>NC_002695.2:c189434-188610 Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome
ATGCAGCAGTTACAGAACATTATTGAAACCGCTTTTGAACCGCTGCCGAGATCACGCCAGCCAATGCAG
ACACCGTTACCCGCGAAGCGGTAATCAGGTGATCGCCCTGCTGGATTCCGGCGCACTGCGGTAGCGGA
AAAAATTGACGGTCAAGTGGGTGACGCATCAGTGGTTGAAAAAAGCGGTGCTCTCTTCCGATTAAT
GATAATCAGGTGATCGAAGGGGCGAAGGCGCTACTTCCACAAAGTCCGGATGAAATTCGCCGACTACG
ACGAAGCACGTTTCCAGAAAAGAGGCTTCCGCGTTGTACCACCTGCGCGGTACGTGAGGGTGCCTTAT
TGCCCGTAACACCGTCTGATGCCCTTACGCTCAACATCGGGCATATGTTGATGAAGGCCACCATGGTC
GATACCTGGGCGACCGTCTGTTCTTGTGCGCAGATTGGTAAAAACGTCACCTTTCCGGTGGCGTGGGCA
TCGGCGGTGTGCTGGAACCGCTGACGGTAACCAACCATCATTGAAGATAATGCTTCATCGGCGCGCG
CTCTGAAGTAGTTGAAGGGGTGATTGTGCAAGAAGGTTCCGTCATTCCATGGGCGTATACATTGGTCAG
AGCACCGTATTACGACCGTGAACCGGCGACATCCACTACGGTCCGCTCCGGCGGGGTCTGTGGTTG
TTTCAGGTAACTGCGCGTGAAGATGGCAATACAGCCCTACTGTGCGGTTATCGTTAAGAAAGTTGA
CGCGAAAACCTCGCGCAAAAGTCGCGCATTAAACGAACCTGCTGGTACCACGACTAA
    
```

Gambar 1. Format FASTA gen *dapD* *Escherichia coli* [11].

Terdapat 10 rekomendasi primer dari NCBI Primer Blast dengan spesifikasi yang tertera pada Tabel 1. Kelima pasang primer baik *forward* maupun *reverse* memiliki panjang 20 pb. Primer yang kurang dari 30 pb tidak disarankan karena kemungkinan dapat menempel pada daerah lain yang tidak diinginkan (*mispriming*). Begitupula jika primer dengan panjang lebih 30 pb, akan terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak akan membentuk produk polimerisasi DNA [12].

Tabel 1. Rekomendasi urutan primer dari situs *ncbi* [13]

No	Primer	Panjang produk (pb)
1	F ATTGACGGTCACTGGGTGAC R TGGAACCGTGCTTCGTCGTA	152
2	F AGCCAATGCAGACACCGTTA R TTTCTGCCCTTCGATCACC	179
3	F TACGACGAAGCACGTTTCCA R TATGCGCCGATGTTGACGTA	122
4	F AAGAAGGCTTCCGCGTTGTA R TCGACCATGGTGCCTTCATC	124
5	F TTACCCGCGAAGCGGTAAT R TAAACGCACCTGACGTACC	273
6	F GGTACGTCAGGGTGCCTTTA R TAGTGGATGTCGCCGTTTC	342
7	F GAAAGAAGGCTTCCGCGTTG R CCAATCTGCGACAAGAACC	162
8	F TACGTCAACATCGGCGCATA R ACGCAGCAGTTCGTTAATGC	435
9	F GCCAATGCAGACACCGTTAC R CAACGCGGAAGCCTTCTTTC	256
10	F CACCATGGTTCGATACCTGGG R CGGTGCTAAATACGGGTGCT	240

Kriteria pemilihan primer lainnya adalah *Tm*. Temperatur Dimana 50% untai ganda DNA terpisah disebut sebagai *melting temperature* (*Tm*). Idealnya, *Tm* yang baik berkisar pada rentang 50-65°C. Nilai *Tm* akan mempengaruhi pemilihan suhu penempelan pada reaksi PCR. Jika suhu *Tm* terlalu rendah, maka primer dapat dengan mudah menempel pada daerah lain sehingga akan mengurangi spesifitas produk PCR. Namun jika *Tm* terlalu tinggi, yaitu >65° maka efektivitas suhu penempelan primer menjadi berkurang yang berakibat pada proses amplifikasi DNA target menjadi tidak maksimal [9]. Perbedaan *Tm* antara primer *forward* dan *reverse* juga tidak boleh terlalu jauh sehingga pemilihan suhu penempelan untuk reaksi PCR menjadi lebih efisien. Pada penelitian ini dipilih primer dengan nilai *Tm* antara primer *forward* dan *reverse* yang tidak berbeda jauh sehingga nantinya suhu penempelan yang akan digunakan pada reaksi PCR pun menyesuaikan dengan nilai *Tm*.

Basa guanin (G) dan sitosin (C) saling berkomplemen dan diikat oleh tiga ikatan hidrogen. Persentase kedua basa ini dinyatakan sebagai %GC yang idealnya berada pada rentang 40-60% dalam primer. Keberadaan basa guanin dan sitosin yang ideal akan membantu primer berikatan secara spesifik dengan DNA *template*. Jumlahnya yang terlalu sedikit akan menurunkan spesifitas penempelan primer

[8]. Untuk mencegah pembentukan dimerisasi antar primer, jumlah basa G dan C pada lima basa terakhir di ujung 3' tidak boleh melebihi 3. Keberadaan basa GC di ujung 3' dapat meningkatkan stabilitas ikatan primer dengan DNA *template* selama proses PCR. Namun, jika jumlahnya melebihi 3, akan mengurangi spesifitas karena basa AT lebih toleran terhadap *mismatch* dibanding basa GC. Dimer terbentuk dari hibridisasi antara basa primer yang saling identik. Jika terdapat dimer dalam primer, maka enzim DNA polimerase akan mengikat bagian yang identik dan memperpanjang kedua bagian tersebut. Hal ini berakibat pada penurunan efisiensi proses amplifikasi dan dapat dihasilkan produk yang tidak diinginkan [14]. Semua primer rekomendasi memenuhi kriteria karena dimer pada ujung 3' tidak melebihi 3.

Tabel 2. Parameter hasil desain primer [13]

Primer No	Panjang oligonukleotida	<i>Tm</i> (°C)	% GC	Dimer pada ujung 3'	Self-Complementary
1	20	59,97	55	3	7
	20	59,97	50	3	4
2	20	59,96	50	2	4
	20	60,04	55	1	4
3	20	59,97	50	0	4
	20	59,90	50	2	4
4	20	59,97	50	2	7
	20	60,11	50	2	8
5	20	60,11	50	2	7
	20	60,04	55	2	4
6	20	60,04	55	2	4
	20	60,11	55	1	4
7	20	60,11	50	0	7
	20	60,11	50	0	6
8	20	59,90	50	2	4
	20	59,83	50	2	4
9	20	59,83	55	3	4
	20	60,11	55	2	7
10	20	59,89	60	2	8
	20	60,18	55	0	6

Self-complementary merupakan parameter yang digunakan untuk memprediksi kemungkinan pembentukan struktur tiga dimensi yang terbentuk dari dimerisasi antar primer maupun pada primer lain. Jumlahnya semakin sedikit semakin baik untuk mencegah pengikatan yang tidak spesifik dan pengurangan produk PCR [12]. Pada penelitian ini, selain berdasarkan kriteria primer yang baik, pemilihan primer juga

mempertimbangkan posisi target primer agar bisa membaca hampir seluruh sekuens gen *dapD* yang berjumlah 825 pb sehingga dipilih primer yang dekat dengan ujung 5' dan 3' gen *dapD* yaitu primer *forward* nomor 3 dan primer *reverse* nomor 8. Primer *forward* nomor 3 dapat membaca dari urutan basa 60, sedangkan primer *reverse* nomor 8 dapat membaca mulau dari urutan basa 813.

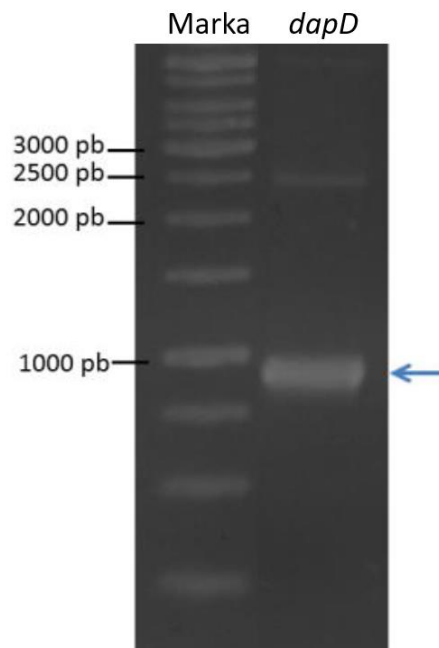
Selanjutnya dilakukan analisis homologi sekuens asal primer dengan database nuklotida yang tersedia di GenBank NCBI melalui program BLAST-Nucleotide. Analisis homologi ini dilakukan untuk memastikan bahwa pasangan primer unik dan spesifik terhadap gen *dapD* *Escherichia coli* [15]. Hasil pensejajaran menunjukkan kesamaan sekuens asal primer terhadap gen *dapD* di organisme target *Eschechia coli* dengan tingkat kesamaan 100%.

Escherichia coli strain H106 chromosome, complete genome			
Sequence ID: CP144364.1 Length: 4732110 Number of Matches: 1			
Range 1: 3750394 to 3750413 GenBank Graphics			
Score	Expect	Identities	Gaps
40.1 bits(20)	2.6	20/20(100%)	0/20(0%)
Query	1	CAATGCAGACACCGTTACCC	20
Sbjct	3750394	CAATGCAGACACCGTTACCC	3750413

Gambar 2. Hasil pensejajaran NCBI-Blast [16].

3.2 Amplifikasi Fragmen Gen *dapD* dengan Teknik PCR

Keberhasilan desain primer secara *in silico* dapat dikonfirmasi menggunakan PCR. Suhu penempelan dioptimasi mulai dari suhu 55-60°C dan diperoleh suhu optimum pada 55°C. Pada Gambar 3 dapat dilihat hasil amplifikasi PCR gen *dapD* berukuran sekitar 800 pb.



Gambar 3. Elektroforegram konfirmasi hasil amplifikasi gen *dapD*.

4 Kesimpulan

Sebagai langkah awal untuk menghasilkan sistem seleksi berbasis non-antibiotik, pada penelitian ini telah dilakukan perancangan kandidat primer sekuens gen *dapD* dari organisme *Escherichia coli* dan dikonfirmasi menggunakan teknik PCR. Hasil perancangan menggunakan NCBI Primer Blast didapatkan 10 kandidat pasangan primer yang kemudian diseleksi berdasarkan kriteria panjang oligonukleotida, T_m , %GC, posisi penempelan DNA target, dimer ujung 3', dan *self-complementary*. Primer *forward* yang dipilih memiliki urutan 5'-TACGACGAAGCACGTTTCCA-3' dan primer *reverse* 5'-ACGAGCAGTTCGTTAATGC-3'. Produk berukuran ± 800 pb berhasil diamplifikasi menggunakan PCR dan dikonfirmasi dengan elektroforesis agarosa 1%.

5 Pernyataan

5.1 Penyanggah Dana

Penelitian ini tidak mendapatkan pendanaan dari sumber manapun.

5.2 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6 Daftar Pustaka

- [1] Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: Now and forever. Vol. 4, Pathogens. MDPI AG; 2015. p. 157–81.
- [2] Noh MH, Lim HG, Moon D, Park S, Jung GY. Auxotrophic Selection Strategy for Improved Production of Coenzyme B12 in *Escherichia coli*. iScience. 2020 Mar 27;23(3).
- [3] Triassi AJ, Wheatley MS, Savka MA, Gan HM, Dobson RCJ, Hudson AO. L, L-diaminopimelate aminotransferase (DapL): A putative target for the development of narrow-spectrum antibacterial compounds. Front Microbiol. 2014;5(SEP).
- [4] Sodoyer R, Courtois V, Peubez I, Mignon C. Antibiotic-Free Selection for Bio-Production: Moving Towards a New “Gold Standard.” J Bacteriol. 2012.
- [5] Peubez I, Chaudet N, Mignon C, Hild G, Husson S, Courtois V, et al. Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production. Microb Cell Fact. 2010.
- [6] Pahlevi MR. Desain Primer untuk Identifikasi Gen GmDREB2 pada Kedelai. Jurnal Agrinis. 2016;1(1).
- [7] Sihotang MAED, Erwinda YE, Suwarni E, Lusianti E. Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety. 2021 Nov 30;1(2):20–9.
- [8] Pradnyaniti DG, Yowani S. Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* Mycobacterium tuberculosis dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). Jurnal Farmasi Udayana. 2013.
- [9] Fakhri TM, Wijaya S, Priani SE. Desain Primer Gen 12S sRNA dari DNA Mitokondria Babi (Sus scrofa) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. Jurnal Sains Farmasi & Klinis. 2021 Dec 14;8(3):316.
- [10] Desy Yustinadewi P, Yustiantara PS, Narayani I. VARIANT PRIMER DESIGN TECHNIQUES IN PEDIATRIC PATIENT BUFFY COAT SAMPLES WITH LLA. 2018;(1):105–11.
- [11] FASTA gen *dapD* [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_002695.2?report=fasta&from=188610&to=189434&strand=true
- [12] Eling Sasmito DK, Kurniawan R, Muhimmah I. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis. 2014.
- [13] Kandidat primer [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1709207110&job_key=XkWx_0315NHb49_tvspTk6Xu34K28cKH
- [14] Ketut L, Maitriani B, Nengah Wirajana I, Sagung D, Yowani C. Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen *InhA* Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry). 2015;3(2).
- [15] Mardini I, Zahrani A, Pane R, Wijayanti F. Desain Primer Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (Cox1) Secara in Silico Untuk Mengidentifikasi Cemaran Daging Babi (Sus Scrofa). Vol. 5, Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan. 2022.
- [16] Hasil Pensejajaran [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>