

DESAIN PRIMER GEN PENGKODE DEPENDENT RNA POLIMERASE (RdRp) UNTUK DETEKSI SARS COV2 DENGAN MENGGUNAKAN qPCR

*Primer Design of Dependent RNA Polymerase (RdRp) Genes to
Detection of SARS COV2 using qPCR*

Fusvita Merdekawati^{1*}, Betty Nurhayati¹

^{1*} Jurusan TLM, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan
Bandung

*Email: fusvitamerdekawati@gmail.com

ABSTRACT

Detection of infection due to SARS COV2 was carried out Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) by detecting the viral RNA sequence as the gold standard. One of the targeted viral genes is RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The RdRp gene is known as a specific marker for infection with the SARS-COV2 virus. Primer is an important component in a molecular detection system. serves as a barrier for the target DNA fragment to be amplified. This study aims to design primers for the RdRp coding gene. This type of research is Quasi Experiment. Primer design was carried out *in silico* using 3 plus primer. This research was conducted in the Molecular Biology Laboratory, Department of Medical Laboratory Technology, Bandung Polytechnic. Based on the research results, the forward primer sequence was ACCGTAGCTGGTGTCTCTAT and the reverse primer sequence was GTGCCAACCACCATAGAATTG. The results of the amplification of the primers resulting from the RdRp gene design in SARS-COV2 obtained a CT value of 21,627 under the following PCR conditions: Reverse transcription at 37°C, 15 minutes, 1 cycle, Inactivation of Reverse transcriptase and Activation of DNA Polymerase at 95°C for 10 minutes, 1 cycle, Denaturation at 95°C for 10 seconds, 40 cycles, annealing at 56°C for 10 seconds 40 cycles. Followed by the extension stage at 72°C for 30 seconds for 1 cycle.

Keywords: SARS COV2 and primer design.

ABSTRAK

Deteksi adanya infeksi karena SARS COV2 dilakukan menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) dengan mendeteksi urutan RNA virus sebagai gold standarnya. Gen virus yang ditargetkan salah satunya adalah RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Gen *RdRp* diketahui sebagai penanda spesifik adanya infeksi virus SARS-COV2. Primer merupakan komponen penting dalam sistem pendeteksian secara molekuler. berfungsi sebagai pembatas dari fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer gen pengkode *RdRp*. Jenis penelitian yang dilakukan adalah Quasi Eksperimen. Design primer dilakukan secara *in silico* menggunakan primer3 plus. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Bandung. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh urutan primer forward adalah ACCGTAGCTGGTGTCTCTAT dan urutan primer reverse adalah GTGCCAACCACCATAGAATTG. Hasil amplifikasi dari primer hasil desain gen *RdRp* pada SARS-COV2 diperoleh nilai CT 21.627 dengan kondisi PCR sebagai berikut: *Reverse transcription* pada suhu 37°C, 15 menit, 1 siklus, Inaktivasi *Reverse transcriptase* dan Aktivasi DNA Polimerase pada suhu 95°C selama 10 menit, 1 siklus,

Denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, 40 siklus, annealing pada suhu 56°C selama 10 detik 40 siklus. Dilanjutkan tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik 1 siklus.

Kata kunci: SARS COV2 dan desain primer

PENDAHULUAN

Virus Corona atau severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) adalah virus yang menyerang sistem pernapasan. Penyakit karena infeksi virus ini disebut Corona Virus Disease 19 (COVID-19). Infeksi karena SARS-CoV-2 dinyatakan oleh World Health Organization (WHO) sebagai pandemi. SARS-CoV-2 diklasifikasikan kedalam genus *Betacoronavirus* (subgenus *Sarbecovirus*) dari family *Coronaviridae*. Virus ini merupakan virus berselubung (*enveloped*) dengan asam ribonukleat (RNA) untai tunggal sense positif dan jumlah genom 30 kb. Genom virus ini mengkodekan protein-protein non-struktural, empat protein struktural yaitu *spike* (S), selubung (E), membran (M), nukleokapsid (N) dan protein lainnya. Virus ini menempel pada reseptor *Angiotensin Converting Enzyme2* (ACE2) untuk memasuki sel^{5,1}.

Deteksi adanya infeksi karena SARS COV2 dilakukan dengan menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction dengan mendeteksi urutan RNA virus sebagai gold standarnya. Untuk mendeteksi RNA, hal yang pertama dilakukan adalah menjadikan RNA yang beruntai tunggal menjadi beruntai ganda yang disebut dengan. DNA komplementer (*complementaryDNA/cDNA*). Pembentukan cDNA dibantu oleh enzim *reverse transcriptase* (RT). Suhu pembentukan cDNA tergantung pada enzim RT yang digunakan. Gen virus yang ditargetkan adalah N (nucleocapsid), E (envelope), dan S (*spike*), serta gen RNA-dependent RNA polymerase^{2,7}.

Deteksi dengan menggunakan PCR terdiri dari tahap isolasi asam

nukleat, amplifikasi DNA menggunakan qPCR dan pembacaan kurva amplifikasi. Pemeriksaan SARS-COV2 dengan menggunakan teknik molekuler menggunakan beberapa reagen yang sudah direkomendasikan oleh WHO. Reagen-reagen tersebut bersifat khusus dan *close system* dimana komponen reagen master mix nya sudah dicampurkan dengan primer sehingga tidak dapat menggunakan reagen pada umumnya^{6,3}.

Primer merupakan komponen penting dalam sistem pendeteksian secara molekuler. Primer berfungsi sebagai pembatas dari fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Setiap sepasang primer yang sesuai dengan DNA target. Primer ini perlu di desain untuk mencapai tingkat keberhasilan yang tinggi dalam deteksi SARS-COV2. Desain primer secara *in silico* akan memudahkan dalam memperoleh primer yang baik untuk proses amplifikasi fragmen gen. Namun diperlukan pula suatu proses deteksi secara *in vitro* dalam menguji keberhasilan primer dalam membentuk produk yang diinginkan^{13,14,15}.

Dalam menguji keberhasilan primer yang didesain diperlukan beberapa kondisi optimasi yang digunakan dalam proses qPCR. Optimasi bertujuan agar proses amplifikasi DNA lebih efisien dan produk yang dihasilkan sesuai dengan yang diinginkan. Optimasi dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut, diantaranya suhu annealing²¹.

Suhu Annealing terlalu tinggi maka amplifikasi akan gagal dikarenakan tidak terjadi penempelan primer dan jika suhu terlalu rendah maka akan menghasilkan spesifitas yang rendah karena primer menempel

pada sisi lain genom²⁰. Aturan umum menyatakan suhu annealing biasanya 3-5°C lebih rendah dari Temperature melting (Tm) primer yang dipilih untuk amplifikasi DNA. Optimasi suhu annealing sangat penting dilakukan agar produk PCR yang didapatkan lebih efektif dan spesifik²².

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mendesain primer gen pengkode RNA Dependent RNA Polimerase.

METODE

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah Quasi Eksperimen. Dalam penelitian ini dilakukan perancangan design primer terlebih dahulu secara *in silico*.

Urutan nukleotida dari gen pengkode RNA Dependent RNA Polimerase (*RdRp*) dicari pada The National Center For Biotechnology Information (NCBI), diperoleh dua urutan secara lengkap dari SARSCOV2 yang diisolasi dari human yang berasal USA dengan nomor gen bank: OP603446.1 untuk *RdRp* dan urutan lengkap dari SARS COV2 yang diisolasi dari human di Wuhan, China dengan nomor gen bank: YP_009725307.1. Urutan gen pengkode *RdRp* yang ada

pada data bank tersebut kemudian dilakukan pensejajaran urutan nukleotida untuk mengetahui kesamaan urutan diantara keduanya. Kemudian diambil urutan yang paling sama, untuk selanjutnya dimaukan kedalam aplikasi online primer3 plus.

Selanjutnya dilakukan uji coba primer yang sudah dirancang di laboratorium dengan Real Time PCR. Uji coba dilakukan dengan memvariasikan suhu annealing untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang optimal. Hasil amplifikasi dari primer hasil desain gen *RdRp* pada SARS-COV2 dihasilkan dalam bentuk kurva amplifikasi, dimana sumbu x menunjukkan jumlah siklus dan sumbu y menunjukkan jumlah flouresensi dari reaksi amplifikasi. Dari hasil kurva amplifikasi diperoleh nilai cycle threshold (CT). Analisis data nilai CT menggunakan Microsoft Excel'

HASIL

Diperoleh beberapa pasang urutan primer yang kemudian dianalisis, dibandingkan dengan syarat primer yang baik sehingga terpilih dan dipesan urutan primer seperti yang tercantum pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Urutan primer yang dipesan

Gen Target	Urutan Primer
RDRP	Forward ACCGTAGCTGGTGTCTCTAT (Sense)
	Reverse GTGCCAACCACCATAGAATTTG (Antisense)

Primer yang sudah dipesan, selanjutnya di uji coba di laboratorium untuk membuktikan apakah primer hasil rancangan dapat digunakan untuk mendeteksi adanya SARS COV2. Untuk mendapatkan hasil yang optimal, dilakukan optimasi suhu Annealing. Suhu annealing divariasikan pada suhu: 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, dan 56°C. Suhu

tersebut divariasikan dengan menggunakan mode gradient pada instrumen real time PCR.

Konsentrasi primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah 200 nM.

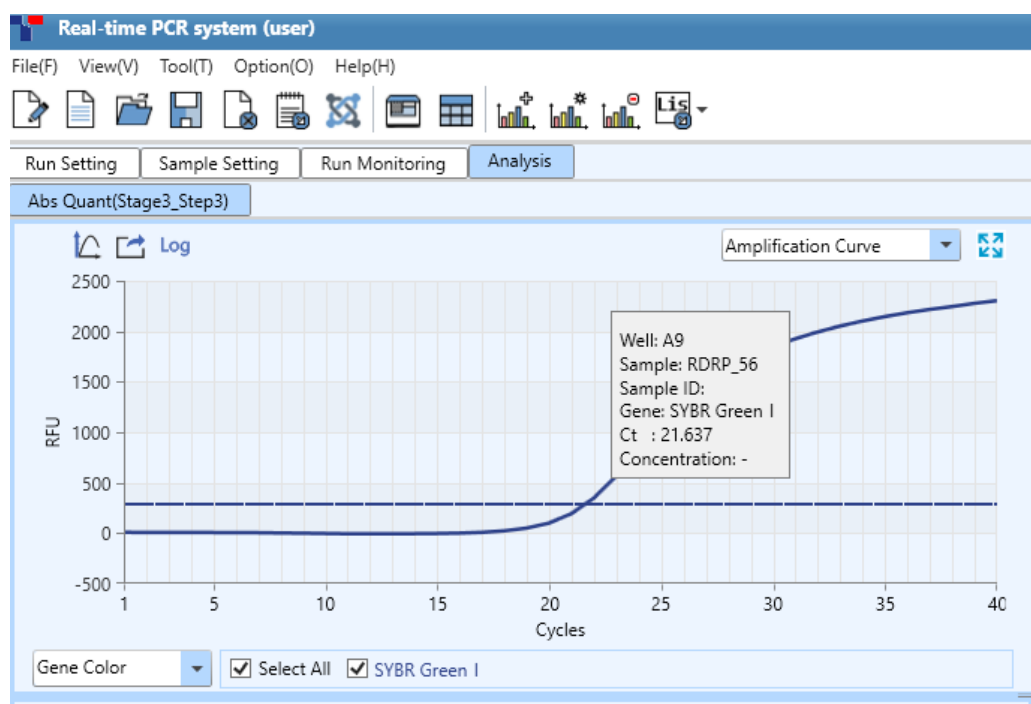
Primer yang dirancang dapat mengamplifikasi masing-masing gen target dengan nilai CT yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai CT Gen Target RdRp

Suhu Annealing (°C)	Nilai CT Gen Target RdRp
52	21.832
53	21.736
54	21.937
55	21.785
56	21.637

Berdasarkan data pada tabel 2 hasil optimal untuk mengamplifikasi gen target dapat dilihat dari terbentuknya nilai CT yang paling kecil, sehingga untuk gen target *RdRp* suhu annealing yang optimal berada pada suhu 56°C. Berikut merupakan gambaran dari kurva amplifikasi pada kondisi suhu annealing optimal. Sehingga kondisi PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Reverse transcription pada suhu 37°C, 15 menit, 1 siklus, Inaktivasi *Reverse transcriptase* dan Aktivasi DNA Polimerase pada suhu 95°C selama 10 menit, 1 siklus, Denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, 40 siklus, annealing pada suhu 56°C selama 10 detik 40 siklus. Dilanjutkan tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik 1 siklus.



Gambar 1. Kurva amplifikasi gen target RdRp dengan kondisi optimal

PEMBAHASAN

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan

diampifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui. Dalam melakukan perancangan primer, perlu

memperhatikan terkait dengan panjang primer, Persen GC, melting temperature dan ineteraksi primer, seperti self dimer, homo dimer dan hetero dimer.

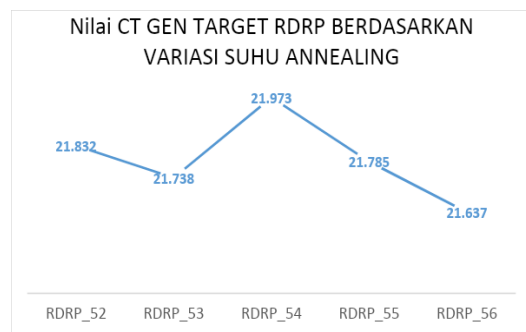
Panjang primer berkisar antara 18–30 pasangan basa. Sedangkan hasil perancangan primer berada pada retang 20-23 pasangan basa, sehingga masuk kedalam persyaratan primer yang baik. primer yang pendek kemungkinan terjadinya mispriming (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi. Hal ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari primer tersebut, dan nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 pasangan basa, tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan lebih mahal.

Persen GC berkisar pada 40-60%, sedangkan hasil perancangan primer berada pada 40-50%. Sehingga masih masuk dalam rentang yang dipersyaratkan. Persen GC ini kaitannya dengan kemampuan primer untuk berkompetisi menempel secara efektif pada template DNA. Jika persen GC nya kurang atau lebih dari yang dipersyaratkan maka akan menurunkan spesifisitas primer. Melting temperature, adalah temperature di mana 50 % untai ganda DNA terpisah. Pemilihan Tm suatu primer sangat penting karena Tm primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu annealing proses PCR. Suhu annealing berkisar antara 50-65°C. Hasil perancangan primer menunjukkan bahwa temperature meltingnya berkisar antara 58-59°C, sehingga dikategorikan dalam primer yang baik.

Interaksi primer, harus dihindari karena hal tersebut akan menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah, terkadinya mispriming pada daerah yang tidak dikehendaki dan akhirnya akan berimbas pada efisiensi produk PCR. Interaksi primer ini dapat dilihat dari nilai ΔG dan Tm. Secara umum

interaksi primer masih ditoleransi dengan nilai ΔG -2 kkal / mol pada ujung 3' dan hairpin internal dengan ΔG -3 kkal / mol. Nilai ΔG yang bertanda minus menandakan bahwa kemungkinan terjadinya hairpin tinggi. Sedangkan jika dilihat dari nilai Tm, jika nilai Tm nya lebih kecil dari nilai Tm penempelan, masih dikatakan bahwa primer tersebut baik^{18,19}.

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi suhu annealing untuk mendapatkan kondisi yang optimal terhadap deteksi SARS-CoV-2 dengan menggunakan metode Real Time PCR. Kit PCR yang digunakan adalah Promega GoTaq qPCR Master Mix dengan menggunakan primer hasil rancangan untuk mendeteksi gen target RdRp, Nukleokapsid, dan Envelop dari SARS COV2.



Gambar 2. Grafik Nilai CT pada Gen target RdRp

Berdasarkan hasil penelitian pada gambar 2 yang telah dilakukan, nilai CT pada gen target RdRp terdapat perbedaan nilai CT pada setiap variasi suhu annealing 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C. Nilai CT pada variasi suhu 53°C ke 54°C mengalami peningkatan. Namun, terjadi penurunan pada suhu 55°C, dan 56°C. Hal tersebut menunjukkan bahwa suhu annealing sangat berpengaruh terhadap nilai CT, namun kenaikan suhu tidak berbanding lurus dengan peningkatan ataupun penurunan nilai C^{9,11}. Nilai CT yang rendah menunjukkan bahwa kurva amplifikasi pada suhu annealing tersebut muncul terlebih dahulu dibandingkan dengan

suhu lainnya. Hal tersebut disebabkan karena pada suhu tersebut jumlah templat DNA yang telah menempel dengan primer lebih banyak dibandingkan dengan suhu yang lainnya. Sehingga suhu annealing yang optimal pada deteksi SARS-CoV-2 untuk gen target RdRp adalah 56°C^{10,13}.

Salah satu hal penting dalam penentuan nilai CT dari suatu reaksi dapat dilihat dari jumlah templat yang digunakan pada awal reaksi. Jika jumlah templat pada awal reaksi dalam jumlah banyak, maka siklus yang dibutuhkan agar produk memberikan sinyal fluoresensi relatif sedikit, sehingga nilai CT menjadi rendah. Sebaliknya, jika pada awal reaksi jumlah templat sedikit, maka siklus yang dibutuhkan menjadi lebih banyak sehingga nilai CT meningkat^{15,16}.

Sensitivitas dapat diukur dari seberapa awal CT suatu target muncul dalam suatu kurva amplifikasi. Namun, ukuran sensitivitas sebenarnya dari volume templat berdasarkan pada kesesuaian hasil yang diberikan kurva standar dengan jumlah templat tanpa mengurangi efisiensi dari amplifikasi yang diinginkan^{11,17}. Pada penelitian ini tidak digunakan kurva standar, sehingga parameter yang digunakan untuk optimalitas suhu annealing hanya dilihat dari nilai CT terkecil.

SIMPULAN

Urutan primer Forward **ACCGTAGCTGGTGTCTCTAT(Se nse)** dan primer Reverse **GTGCCAACCACCATAGAATTG (AntiSense)**.

Primer tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi adanya gen RNA Dependent RNA Polimerase yang ada pada SARS COV2, dibuktikan dengan terbentuknya kurva amplifikasi dengan nilai CT CT 21.637

Kondisi PCR optimal melalui tahapan: Reverse transcription pada

suhu 37°C, 15 menit, 1 siklus, Inaktivasi *Reverse transcriptase* dan Aktivasi DNA Polimerase pada suhu 95°C selama 10 menit, 1 siklus, Denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, 40 siklus, annealing pada suhu 56°C selama 10 detik 40 siklus. Dilanjutkan tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik 1 siklus.

DAFTAR RUJUKAN

1. Abbas, N., Rasool, M. and Afroze, T. 'PCR based diagnosis of hepatitis B virus', Pakistan Journal of Zoology. 2015 37(4), pp. 285–288.
2. Alves, N., Zauli, G., Lisandre, C., Menezes, P. D., Lommez, C., Oliveira, D., . . . Ferreira, S. D. Genetics and Molecular Microbiology. 2016
3. Behlke, M. A., Jäger, K. B. and Brown, T. Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology. 2019 Caister Academic Press. doi: <https://doi.org/10.21775/9781912530243>.
4. Bergkvist, A. et al. A Technical Guide PCR Technologies. Edited by T. Nolan. Sigma-Aldrich. 2012 Available at: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/pcr-technologies-guide.pdf
5. Bio-Rad laboratories. 'Real-Time PCR Applications Guide', Methods, 2006, pp. 2–85
6. Bliert. PCR Optimization and Troubleshooting 2016. Available at: <http://www.dnagdans.com/media/Downloads/pcr-optimization-and-troubleshooting.pdf>.
7. Chook, J. B. et al. 'Universal Primers for Detection and Sequencing of Hepatitis B Virus Genomes across Genotypes A to G', 2015. Journal of Clinical Microbiology, 53(6).
8. Ehtisham, M. et al. 'Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics', Indian Journal of Contemporary Dentistry, 4(2), p. 30. 2016 doi: 10.5958/2320-5962.2016.00030.9.
9. Gunson, R., Gillespie, G. and Carman,

- W. F. 'Optimisation of PCR reactions using primer chessboarding', *Journal of Clinical Virology*, 26(3), pp. 2003. 369–373. doi: 10.1016/S1386-6532(03)00006-4.
10. Hartanti, M. D. Real-Time Polymerase Chain Reaction for detecting SARS-COV2 in Indonesia: Are the results reliable? *Universa Medicina*. 2020 39(2), 71. <https://doi.org/10.18051/univmed.2020.v39.71-73>
11. Joshi, M. and Deshpande, J. D. 'Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application', 2012, *International Journal of Biomedical Research*, 2(1). doi: 10.7439/ijbr.v2i1.83.
12. Kalendar, R., Lee, D. and Schulman, A.H. 'FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis', 2014 p. 271.
13. Kim, J., Lim, J. and Lee, C. 'Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations', *Biotechnology Advances*. 2013. Elsevier Inc., 31(8), pp. 1358–1373. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010
14. Kim, J., Lim, J. and Lee, C. 'Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations', *Biotechnology Advances*. 2013. Elsevier Inc., 31(8), pp. 1358–1373. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010
15. Kim, N., Kwon, A., Roh, E. Y., Yoon, J.H., Han, M. S., Park, S.-W., Park, H., & Shin, S. Effects of Storage Temperature and Media/Buffer for SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection. 2020 *American Journal of Clinical Pathology*, 280–285. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa207>
16. Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J., & Hsueh, P. R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. 2020. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 55, Issue 3, p. 105924). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
17. Liu, S. Y. et al. 'Three-dimensional structure of the hepatitis B core antigen particle truncated at residue 154', *Science China Life Sciences*, 54(2), pp. 2011 171–174. doi: 10.1007/s11427-010-4098-x.
18. Lorenz, T. C. 'Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies', 2012, *Journal of Visualized Experiments*, (63), pp. 1–15. doi: 10.3791/3998.
19. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. 2020. In *The Lancet* (Vol. 395, Issue 10224, pp. 565–574). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
20. Ludyasari, A. Pengaruh suhu annealing pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) laguna segara anakan Cilacap Jawa Tengah. 2104. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
21. Nurhayati, B. and Darmawati, S. *Biologi Sel dan Molekuler*. 2017. 1st edn. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
22. Oktaviani, D.P. Optimasi Suhu Annealing dan Konsentrasi Primer Gen Pengkode Hepatitis B Core Antigen Untuk Deteksi Virus Hepatitis B Metode Real Time PCR. 2020 Bandung: Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung