



Analisis Spesifisitas dan Sensitivitas Primer untuk Identifikasi *Cryptococcus neoformans*

Dwi Febriyana, Tati Febrianti, Sunarno
Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Email : dwi.febriyana@gmail.com

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima: 25 Mei 2021
Disetujui: 5 Juni 2021
Dipublikasikan: 30 Juni 2021

Kata kunci:

Cryptococcus Neoformans,
Primer,
Spesifisitas,
Sensitivitas

Abstrak

Cryptococcus neoformans merupakan jamur yang berbahaya penyebab kriptokokosis. Infeksi yang terjadi pada manusia oleh jamur ini melalui inhalasi basidiospora atau sel khamir kering yang tersebar di lingkungan. Penentuan *Cryptococcus neoformans* dapat dilakukan melalui metode molekuler. Metode molekuler yang berkembang melalui metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Salah satu faktor penting dalam keberhasilan PCR adalah pemilihan primer yang memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi. Dalam penelitian ini kita akan menggunakan beberapa set primer yang didapat dari literatur review dan dianalisis menggunakan program perl primer Ver.1121 serta website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hasil analisis didapatkan primer dengan panjang berkisar antara 18-25, %GC lebih dari 50%, *melting temperature* (Tm) tidak lebih dari 70°C, dan target isolat yang spesifik. Hasil analisis ini diharapkan dapat memberikan informasi primer yang memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi untuk identifikasi *Cryptococcus neoformans*.

PENDAHULUAN

Cryptococcus neoformans termasuk dalam genus *Cryptococcus* dan termasuk dalam filum *Basidiomycota* yang ditemukan pada tahun 1890. Habitat utama dari *C.neoformans* adalah tanah yang mengandung material tanaman yang membusuk, lapukan kayu pada celah atau lubang pohon, dan kotoran burung (Machrumnizar et al., 2016). Jamur ini dapat menyebabkan penyakit kriptokokosis yang umumnya dialami oleh penderita dengan system imun yang rendah seperti penderita *human immunodeficiency virus* (HIV), pasien dengan pengobatan kortikosteroid yang panjang, transplantasi organ, dan keganasan limforetikuler. Infeksi oleh *C. neoformans* ini dapat menyebabkan meningitis dan meningoensephalitis pada orang yang terinfeksi HIV/ AIDS didiagnosis sebagai kriptokokal meningitis. Kasus ini ditemukan pada lima sampai sepuluh persen orang yang terinfeksi HIV menderita kriptokokosis dan untuk populasi umum sekitar 0.4-1.3 kasus perseratus ribu orang (Efrida & Ekawati, 2012).

Infeksi dari *C. neoformans* dimulai dengan inhalasi sel ragi kecil atau basidiospora yang memicu terjadinya kolonisasi pada saluran napas dan diikuti dengan infeksi. Pada penderita meningitis kriptokokosis jamur ini dapat berdiseminasi secara homogen terutama ke sistem saraf pusat dan melalui aliran darah dapat menembus sawar darah otak (SDO) yang kemudian bereplikasi dengan cepat sehingga terjadinya peradangan di meninges dan parenkim otak (meningoensephalitis). Deteksi *C.neoformans* ini dilakukan dengan berbagai metode antara lain kultur, tinta india, deteksi antigen *Cryptococcus*, maupun molekuler (Wijaya, 2021). Salah satu metode yang potensial untuk deteksi *C. neoformans* melalui molekuler dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Metode ini dimungkinkan dapat mendeteksi jamur dan

genotif strainnya (Martins et al., 2015). Selain itu, metode PCR dipilih karena relatif mudah dan cepat dengan spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi (Budiarto, 2015).

Metode PCR merupakan metode sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) serta terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya. Komponen yang dibutuhkan dalam PCR ini salah satunya menggunakan primer. Primer mempengaruhi spesifisitas dan sensitivitas dalam reaksi PCR. Rancangan primer yang kurang baik akan membuat produk primer yang dihasilkan tidak spesifik dan menghasilkan primer dimer (Yustinadewi et al., 2018). Saat rancangan primer yang baik agar menghasilkan spesifisitas dan sensitivitas yang baik perlu diperhatikan beberapa hal antara lain panjang primer berkisar antara 18-30 nukleotida, *melting temperature* (T_m) berkisar antara 52-58°C, komponen GC berkisar antara 45-60%, sebaiknya diujung 3' mengandung komponen G atau C sehingga lebih stabil, tidak mengandung komplemen pada primer dan pasangan primer, dan konsentrasi primer berkisar antara 0.1-0.5 μM (Elsalam, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan primer yang memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi sehingga menghasilkan produk yang baik untuk pemeriksaan *C. neoformans*.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel penelitian berasal dari penelusuran literatur yang didapat dari jurnal yang membahas mengenai deteksi *Cryptococcus neoformans* dengan menggunakan metode PCR. Sumber literatur yang digunakan merupakan literatur yang baru dan kurang dari sepuluh tahun.

Analisis Spesifisitas dan sensitivitas primer

Spesifisitas dan sensitivitas primer harus dipertimbangkan ketika memilih primer yang akan digunakan sehingga primer dapat mendeteksi target yang diinginkan. Spesifisitas primer dilakukan dengan menggunakan program BLAST dari website NCBI (<https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>). Program ini akan membandingkan sekuen primer yang dengan database sekuen dari berbagai organisme yang tersimpan di NCBI. Data primer yang spesifik akan dilihat dari perbandingan hasil yang sesuai dengan target yang diinginkan dan organisme lain dalam bentuk persentase. Primer yang dipilih sebaiknya merupakan primer yang memiliki tingkat persentase tinggi yang sesuai dengan gen target (Ye et al., 2012). Analisis lain yang dibutuhkan menggunakan software *PerlPrimer* untuk melihat panjang basa, % GC, *melting temperature*, dan menghitung dimer yang terjadi. Analisis dengan menggunakan software *PerlPrimer* dilakukan dengan memasukkan data primer *forward* dan *reverse* ke dalam software *PerlPrimer*. Analisis spesifisitas dan sensitivitas primer ini dibutuhkan agar primer dapat menghasilkan produk yang baik (O. J. Marshall, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pencarian literatur dari lima referensi yang diperoleh delapan pasang primer yang digunakan dalam mendeteksi *C. neoformans*. Sepasang primer terdiri dari primer *forward* dan *reverse*. Primer ini dianalisis dengan program BLAST primer dan *PerlPrimer* sehingga didapatkan hasil yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kandidat Data Primer untuk deteksi *C. Neoformans*

No		Sequence (5'-3')	Melting Temperature (T _m)	Panjang Basa	% GC	Ikatan Dimer		% Produk sama dengan target	Referensi
						Extensible	Non Extensible		
1	Forward	ATCACCTTCCCACTAACACATT	59,87	22	40	Tidak ada	Paling tinggi	498 dari 936 (53,2%)	(Martins et al., 2015)
	Reverse	GAAGGGCATGCCTGTTTGAGAG	64,25	22	54		-8,61 kcal/mol		
2	Forward	TGCCCGAAGCCGTTGCTGAG	68,40	20	65	Paling tinggi	Paling tinggi	12 dari 22 (54%)	(Alarousy et al., 2011)
	Reverse	ACCCGAAACCCTTGGCACG	68,13	20	65	-2,59 kcal/mol	-3,29 kcal/mol		
3	Forward	GAGTGTCTCCGCAACCCGCA	67,77	20	65	Paling tinggi	Paling tinggi	12 dari 27 (44%)	
	Reverse	CCTACTCTGCCAAATCAACTC	58,85	21	47	-1,26	-1,47		

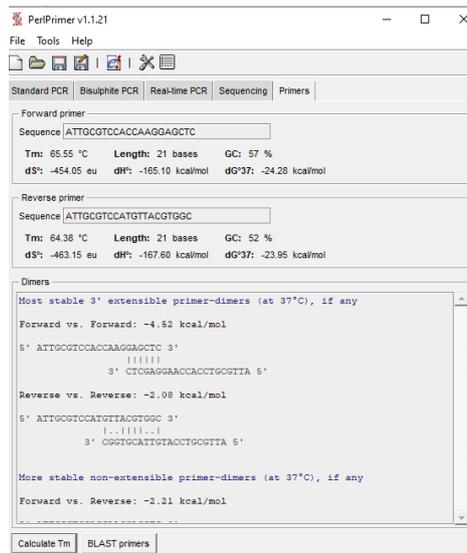
						kcal/mol	kcal/mol		
4	Forward	GCAGCGGCTTGCCATTCGTG	68,07	20	65	Paling tinggi	Paling tinggi	12 dari 23 (52%)	
	Reverse	AGTCCGTGGAGGCGTGGTCA	68,46	20	65	-2,70	-5,21		
						kcal/mol	kcal/mol		
5	Forward	ACCCTACGGGCCACGGACTC	68,60	20	70	Paling tinggi	Paling tinggi	12 dari 24 (50%)	
	Reverse	GGGCACCTTGATGGCTCGCA	68,24	20	65	-2,97	-5,86		
						kcal/mol	kcal/mol		
6	Forward	ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC	65,55	21	57	Paling tinggi	Paling tinggi	6 dari 6 (100%)	(Leal et al., 2008)
	Reverse	ATTGCGTCCATGTTACGTGGC	64,38	21	52	-4,52	-4,69		
						kcal/mol	kcal/mol		
7	Forward	TCCGTAGGTGAACCTTGCGG	64,80	20	60	Paling tinggi	Paling tinggi	0 dari 25 (0%)	(Amirrajab et al., 2016)
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	57,70	20	45	-6,05	-3,69		
						kcal/mol	kcal/mol		
8	Forward	ATCACCTACCATTCACACATT	59,93	22	40	Tidak ada	Paling tinggi	0 dari 9 (0%)	(Cidiane & Fabiana, 2016)
	Reverse	GAAGGGCATGCCAGATGTTTG	62,67	21	52		-8,61		
						kcal/mol	kcal/mol		

Hasil dengan menggunakan program BLAST primer menunjukkan bahwa terdapat sepasang primer yang memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi dengan organisme target dengan Forward : ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC dan reverse: ATTGCGTCCATGTTACGTGGC. Primer tersebut spesifik dalam mendeteksi *C.neoformans* dimana hasil perbandingan menunjukkan tingkat kesesuaian 100 % dengan data yang terdapat di database sekuen. Program ini penting dalam menentukan primer karena dapat mengetahui bahwa primer yang digunakan benar- benar spesifik dan tidak menempel pada organisme lainnya (Sasmito et al., 2014). Penggunaan primer BLAST dapat dilihat pada gambar 1 dimana memperlihatkan primer dibandingkan dengan database sekuen yang ada di NCBI.

Primer pair 1							
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC	21	62.99	57.14	6.00	6.00	
Reverse primer	ATTGCGTCCATGTTACGTGGC	21	61.87	52.38	7.00	5.00	
Products on target templates							
->CP047904.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99 chromosome 03							
product length = 695							
Forward primer	1 ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC 21						
Template	610353C..... 610333						
Reverse primer	1 ATTGCGTCCATGTTACGTGGC 21						
Template	609659 T..... 609679						
->CP048089.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> strain A1_35_8 chromosome (11:3) map t(3:11)(p,q)							
product length = 695							
Forward primer	1 ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC 21						
Template	616518C..... 616498						
Reverse primer	1 ATTGCGTCCATGTTACGTGGC 21						
Template	615824 T..... 615844						
->CP048082.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> strain Ze90-1 chromosome (11:3) map t(3:11)(p,q)							
product length = 695							
Forward primer	1 ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC 21						
Template	1480151C..... 1480171						
Reverse primer	1 ATTGCGTCCATGTTACGTGGC 21						
Template	1480845 T..... 1480825						
->CP025719.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> strain EN28 chromosome 3, complete sequence							

Gambar 1. Analisis sepasang Primer dengan menggunakan primer BLAST

Pengujian primer selanjutnya dengan menggunakan software *PerlPrimer*. *PerlPrimer* merupakan aplikasi yang digunakan untuk design primer baik PCR standar, *real time* PCR, maupun untuk sequencing (O. Marshall, 2007). Software ini digunakan untuk memprediksi masalah yang timbul jika primer diaplikasikan pada pemeriksaan (Sunarno & Novriani, 2016). Pengujian dengan menggunakan *PerlPrimer* diperlihatkan pada gambar 2. Hasil dari analisis diperoleh bahwa primer yang diuji memiliki kriteria yang cukup baik sebagai kandidat primer. Kriteria tersebut antara lain panjang primer %GC content sebesar 40-60%, Tm 52-58°C, panjang primer 18-30 basa, tidak terdapat hairpin dan pengulangan lebih dari 4 basa (Elsalam, 2003; Sunarno & Novriani, 2016). Semakin baik kandidat suatu primer maka akan meningkatkan tingkat sensitivitas suatu primer.



Gambar 2. Analisis sepasang primer dengan menggunakan *PerlPrimer*

Panjang primer yang terlalu pendek akan mengurangi kespesifikan primer sedangkan primer yang terlalu panjang akan membuat reaksi PCR tidak berjalan efektif, sedangkan untuk % GC content pada sebaiknya tidak terlalu rendah karena akan menurunkan tingkat spesifisitas karena menyebabkan *mispriming* ditempat lain. Pada tabel 1 memperlihatkan terdapat beberapa primer yang memiliki % GC content melebihi 60%. Hal lain yang perlu diperhatikan yaitu ujung 3 dari primer sebaiknya basa G atau C karena basa A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dibanding G atau C (Dieffenbach & Dveksler, 1995; Handoyo & Rudiretna, 2001).

Kriteria lain agar primer menjadi kandidat yang baik adalah tidak terjadi pengulangan lebih dari empat basa. Pada tabel 1 primer *forward* nomor 8 (ATCACCTACCATTACACATT) memperlihatkan bahwa terjadi pengulangan CACACA. Hal ini sebaiknya dihindari karena dapat menyebabkan penempelan primer di tempat yang tidak diinginkan (*mismatch*). Hasil lain yang didapat dengan menggunakan *PerlPrimer* adalah ikatan dimer. Nilai ikatan sebaiknya tidak melebihi dari nilai -7kcal/mol dan beberapa literatur menyebut bisa sampai nilai -9kcal/mol dimana bila nilai ini semakin tinggi maka dibutuhkan energi yang lebih tinggi dalam memecah struktur atau ikatan bila terjadi dimer (Sunarno & Novriani, 2016). Primer yang terdapat pada tabel memperlihatkan delta G tertinggi sebesar $-8,61\text{kcal/mol}$.

Kandidat primer yang baik tidak hanya dilihat dari tingkat spesifisitas yang tinggi tetapi juga melihat dari sensitivitasnya. Sepasang primer *Forward* : ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC dan *reverse* : ATTGCGTCCATGTTACGTGGC ini memperlihatkan bahwa tidak hanya memiliki tingkat Spesifisitas nya yang tinggi tetapi juga memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dengan memenuhi kriteria kandidat primer yang baik. Primer ini diharapkan dapat mendeteksi *C. neoformans* dengan baik sehingga dapat dipergunakan dalam pemeriksaan dan memperlihatkan hasil yang baik.

PENUTUP

Analisis data menggunakan program BLAST primer menghasilkan sepasang primer yang memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi karena sesuai dengan produk yang diinginkan. Selain itu, Analisis melalui *PerlPrimer* didapatkan primer yang diuji memiliki kandidat primer yang cukup baik dibandingkan dengan kriteria syarat- syarat primer. Dilihat dari kedua aplikasi ini didapatkan sepasang primer yang baik. Primer tersebut diharapkan dapat mendeteksi *C. neoformans* dengan baik sehingga memperlihatkan hasil yang diharapkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang berperan. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Vivi Setiawaty sebagai Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) dan Ketua Panitia Pembina Ilmiah (PPI) PBTDK.

DAFTAR PUSTAKA

- Alarousy, R., Abo, H., Yazeed, E., Kotb, H., Abdalla, K., & Refai, M. (2011). Amplification of Capsule-associated Genes from *Cryptococcus neoformans*. *New York Science Journal*, 4(11), 1–5. <http://www.sciencepub.net/newyork>
- Amirrajab, N., Haghani, I., Rasuli, M., & Shokohi, T. (2016). Migratory birds as a potential reservoirs of *cryptococcus neoformans*. *International Journal of Environmental Research*, 10(3), 459–464. <https://doi.org/10.22059/ijer.2016.58765>
- Budiarto, B. R. (2015). Polymerase Chain Reaction (Pcr) : Perkembangan Dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *BioTrends*, 6(2), 29–38.
- Cidiane, G. M., & Fabiana, R.-S. (2016). Use of Polymerase chain Reaction for *Cryptococcus neoformans* Genome Detection in Cerebrospinal Fluid for Neurocryptococcosis Diagnosis. *Medical Mycology: Open Access*, 2(2), 1–7. <https://doi.org/10.21767/2471-8521.100013>
- Dieffenbach, C. W., & Dveksler, G. S. (1995). *PCR Primer: A Laboratory Manual*.
- Efrida, E., & Ekawati, D. (2012). Kriptokokal meningitis: Aspek klinis dan diagnosis laboratorium. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(1), 39–44. <https://doi.org/10.25077/jka.v1i1.7>
- Elsalam, K. A. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91–95.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Leal, A. L., Faganello, J., Bassanesi, M. C., & Vainstein, M. H. (2008). *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Medical Mycology*, 46(4), 377–383. <https://doi.org/10.1080/13693780701824429>
- Machrumnizar, Sjamsuridzal, W., & Wahyuningsih, R. (2016). *Cryptococcus neoformans*: Ekologi, Faktor Virulensi, Patogenesis dan Identifikasi. *Majalah Kedokteran UKI, XXXII No.2*.
- Marshall, O. (2007). *Graphical Design of Primers with PerlPrimer* (Vol. 402, Issue 2). Springer, Method In Molecular Biology. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_21
- Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15), 2471–2472. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
- Martins, M. dos A., Brighente, K. B. S., de Matos, T. A., Vidal, J. E., de Hipólito, D. D. C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2015). Molecular diagnosis of cryptococcal meningitis in cerebrospinal fluid: Comparison of primer sets for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.09.004>
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis 2014*, 93–102. <http://snimed.fit.uui.ac.id/>
- Sunarno, & Novriani, H. (2016). Desain Primer PCR Secara Manual untuk Amplifikasi Gen dtx Bakteri Penyebab Difteri dengan Masalah Homologi Sekuens DNA. *The Biomedical and Basic Health Tecnology, Health Research and Development Centre, Jakarta*, 66(12), 2.
- Wijaya, M. (2021). Meningitis Kriptokokus pada Penderita HIV. *Cermin Dunia Kedokteran*, 48(1), 8–11.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer Blast: A tool to design target spesific primer for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134).
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), 105. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16>