

# DESAIN PRIMER DAN PROBE MELALUI PENDEKATAN BIOINFORMATIKA UNTUK DETEKSI GEN GAG HIV-1 MENGGUNAKAN qRT-PCR

Asryadin<sup>1\*</sup> · Nur Aini Hidayah Khasanah<sup>2</sup> · Nilasari Indah Yuniati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi D4 TLM, STIKes Bina Cipta Husada Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia  
e-Mail: asryadin@stikesbch.ac.id  
No Tlp WA : 085338179323

## Abstract

*Testing for HIV viral load confirmation using qRT-PCR is a test that must be carried out for therapy monitoring. Developing a qRT-PCR-based HIV detection method targeting conserved gene sequences in HIV-1, such as the HIV-1 Gag gene, could be an alternative to developing molecular-based detection methods. This study aims to design primers and probes of the HIV-1 Gag gene suitable for qRT-PCR through a bioinformatics technique. The HIV-1 Gag gene sequence was downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database GenPeptd (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Next, quality and homology tests were carried out on the primer pair sequences and the HIV-1 Gag gene probe. Based on the research results, a primer pair sequence for the HIV-1 Gag gene was obtained that met the requirements, namely 5'-GACATCAAGCAGCCATGC-3' (forward) and 3'-CCAATCCAGGACGTACGTG 5' (reverse), with the probe sequence 5'-GGAAGCTGCAGAATGGGACAG-3'. The primer sequence has a length of 18 bases (forward), 19 bases (reverse), and 21 bases (probe) with a primary GC content of 57% (reverse), 55% (forward), and probe (57%). The melting temperature (T<sub>m</sub>) of the primers was 59°C (forward), 61°C (reverse), and 66°C (probe). No hairpin loops and dimers were formed both in primers and probes, and the gag gene had 100% homology with HIV-1. It can be concluded that the primer and probe pair sequences meet the requirements and can be used to amplify the HIV-1 Gag gene using qRT-PCR.*

**Keywords :** bioinformatics, Gag HIV-1, primer, probe, qRT-PCR

## Abstrak

Pemeriksaan konfirmasi viral load HIV dengan qRT-PCR merupakan pemeriksaan yang wajib dilakukan untuk monitoring terapi. Pengembangan metode deteksi HIV berbasis qRT-PCR dengan target sekuen gen lestari pada HIV-1, seperti gen Gag HIV-1 dapat menjadi alternatif pengembangan metode deteksi berbasis molekuler. Penelitian ini bertujuan merancang desain primer dan probe gen Gag HIV-1 yang sesuai untuk qRT-PCR melalui pendekatan bioinformatika. Sekuen gen Gag HIV-1 diunduh dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database GenPeptd (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Selanjutnya dilakukan uji kualitas dan uji homologi terhadap sekuen pasangan primer dan probe gen Gag HIV-1. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh sekuen pasangan primer gen Gag HIV-1 yang memenuhi persyaratan, yaitu 5'-GACATCAAGCAGCCATGC-3' (*forward*) dan 3'-CCAATCCAGGACGTACGTG -5' (*reverse*), dengan sekuen probe 5'-GGAAGCTGCAGAATGGGACAG-3'. Sekuen primer memiliki panjang 18 basa (*forward*) dan 19 basa (*reverse*) dengan GC content primer 57% (*reverse*), 55% (*forward*) dan 57% (*probe*), suhu leleh (T<sub>m</sub>) primer sebesar 59°C (*forward*), 61°C (*reverse*) dan 66°C (*probe*), tidak terbentuk *hairpin loop* dan dimer pada pasangan primer maupun probe, dan gen *gag* memiliki homologi 100% dengan HIV-1. Dapat disimpulkan bahwa sekuen pasangan primer dan probe memenuhi persyaratan dan dapat digunakan pada amplifikasi gen Gag HIV-1 menggunakan qRT-PCR.

**Kata Kunci :** bioinformatika, Gag HIV-1, primer, probe, qRT-PCR

## PENDAHULUAN

*Human Immunodeficiency Virus* (HIV) adalah virus dengan materi genetik RNA yang menyerang sistem kekebalan tubuh. HIV merupakan agen penyebab utama terjadinya *Acquired Immuno Deficiency Syndrome* (AIDS) setelah lima hingga sepuluh tahun atau lebih terinfeksi HIV. HIV dapat dibedakan atas tipe 1 dan tipe 2. Material genetik HIV-1 berupa dua buah positif *single-strand* RNA pengkode 3 poliprotein utama yaitu Gag (antigen spesifik kelompok), Pol (polymerase) dan Env (envelope), dua protein pengatur Tat (transaktivator transkripsi) dan Rev (pengatur ekspresi virion) serta empat protein tambahan yaitu Vif (faktor infektivitas virion), Vpu (protein virus u), Vpr (protein virus r) dan Nef (faktor regulasi negatif). Gag berperan penting dalam replikasi HIV-1, terutama selama perakitan dan pelepasan partikel infeksi (Marie and Gordon, 2022).

Kasus HIV-1 banyak ditemukan di seluruh dunia, sedangkan HIV-2 lebih umum ditemukan di daerah endemis Afrika Barat. HIV-1 memiliki 9 subtipe, yaitu subtipe A, B, C, D, F, G, H, J, K. Dalam kasus tertentu, 2 virus dengan subtipe berbeda dapat ditemukan di sel tubuh orang yang terinfeksi dan kedua material genetik tersebut akan bercampur membentuk virus hibrida baru (Wibowo, Setiawaty and Salwati, 2011). Penegakan diagnosa yang tepat serta pemberian terapi pengobatan yang adekuat pada pasien terinfeksi sangat penting dilakukan.

*Gold standard* skrining awal penegakan diagnosa HIV di Indonesia dilakukan menggunakan *rapid test antibody*, namun pemeriksaan konfirmasi *viral load* HIV dengan qRT-PCR merupakan pemeriksaan yang wajib dilakukan untuk monitoring terapi. Pada pengujian dengan PCR, sebagian besar deteksi menargetkan sekuen gen Gag HIV-1 (Liu *et al.*, 2017). Hal ini dikarenakan gen Gag HIV-1 merupakan gen paling lestari (*conserved*) pada HIV-1 dan diduga berperan penting dalam menentukan kapasitas replikasi virus (Kapaata *et al.*, 2021). Untuk itu, perlu dilakukan pengembangan metode deteksi HIV berbasis qRT-PCR dengan target

sekuen gen *Gag* HIV-1 sehingga dapat menjadi alternatif metode deteksi berbasis molekuler dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Teknik ini memerlukan primer dan probe dengan persyaratan tertentu yang akan menentukan keberhasilan deteksi fragmen spesifik (Effendi, 2019). Pada penelitian ini dilakukan perancangan desain sekuen pasangan primer dan probe qRT-PCR menggunakan gen *Gag* HIV-1 melalui teknik bioinformatika. Bioinformatika merupakan perpaduan antara ilmu biologi molekuler dan komputasi. Salah satu peran penting bioinformatika yaitu untuk merancang dan menghasilkan sekuen primer (Saraswati and Dwi Wahyuni, 2019).

Desain primer dan probe menjadi faktor paling penting yang mempengaruhi keberhasilan dan kualitas analisis qRT-PCR karena kuantifikasi yang akurat bergantung pada penggunaan primer dan probe yang efisien. Desain primer dan probe harus memenuhi beberapa kriteria untuk menemukan primer dan probe potensial untuk pengujian qRT-PCR diantaranya panjang pasangan primer 15-30 basa, sekuen probe 20-30 basa, *temperature melted* ( $T_m$ ) primer 50-60°C,  $T_m$  probe 68-70°C (8-10°C di atas  $T_m$  primer) kandungan basa guanin (G) dan sitosin (C) (*GC content*) 30-80%, ukuran amplicon 50-150 bp, tidak terjadi *repeats* dan *runs* lebih dari 2 basa yang sama, serta menghindari terbentuknya struktur sekunder (*self*, *cross*, heterodimer) dan *hairpin loop* (Rodríguez *et al.*, 2015). Penelitian ini bertujuan mengetahui kualitas sekuen primer dan probe gen *Gag* HIV-1 yang dapat digunakan dalam metode deteksi dengan qRT-PCR menggunakan teknik bioinformatika.

## BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas seperangkat komputer dengan software *Bioedit sequences alignment editor* versi 7.2.5.0, NCBI *gene bank database*, dan aplikasi Perl Primer.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan populasi dan sampel penelitian adalah sekuen gen *Gag* HIV-1 yang diunduh dari *National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database GenPeptd*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Sekuen gen *Gag* HIV-1 diambil pada serotipe maupun isolat HIV-1 dan disimpan dalam format *FASTA* selanjutnya dilakukan analisis pensejajaran sekuen (*multiple sequences alignment/MSA*) gen menggunakan algoritma *clustaW* software *Bioedit sequences alignment editor* versi 7.2.5.0.. Sebagai acuan dalam menentukan kandidat pasangan primer dan probe digunakan *Region* lestari gen yang diperoleh. Sekuen probe sendiri dipilih pada lokasi diantara sekuen pasangan primer gen *Gag* HIV-1.

Sekuen pasangan primer dan probe yang telah dipilih selanjutnya dilakukan uji kualitas yang terdiri dari: Penentuan *T<sub>m</sub>*, *temperature annealing (T<sub>a</sub>)*, *GC content*, *GC clamp*, *repeats* dan *runs*, serta penentuan/uji untuk melihat terbentuknya struktur sekunder (*self*, *cross*, heterodimer). Selanjutnya dilakukan pengamatan terbentuknya *hairpin loop* serta kesesuaian *T<sub>m</sub>* pasangan primer menggunakan *Perl Primer*. Setelah dilakukan uji kualitas pasangan primer dan probe, kemudian dilakukan analisis kesesuaian pasangan primer dengan organisme target yaitu HRV-1 menggunakan *primer blast nucleotide sequences* NCBI.

## HASIL

Urutan gen *gag* HIV-1 yang diunduh dari *NCBI nucleotide database* *GenPeptd* sebanyak 52 sekuen. Gen *Gag* HIV-1 merupakan gen dengan *conserved region* di antara serotipe HIV. Protein *Gag* sendiri memiliki peran utama dalam perakitan, pelepasan, dan pematangan partikel virus, dan juga berfungsi dalam pembentukan infeksi (Waheed and Freed, 2012).

Posisi sekuen pasangan primer dan probe gen Gag dapat dilihat pada Gambar

1.



Gambar 1. Multiple sequences alignment gen Gag HIV-1 dengan lokasi sekuen pasangan primer dan probe

Sekuen primer forward berada di posisi basa 581 hingga 598, sedangkan sekuen primer reverse berada di posisi basa 655 hingga 673 serta sekuen probe berada diantara sekuen pasangan primer yaitu pada posisi basa 624 hingga 644 (Reference sequence HIV-1 accession number MK479872.1). Panjang amplikon yang diperoleh yaitu 93 pasang basa (Gambar 1). Urutan basa dan hasil uji kualitas pasangan primer gen Gag HIV dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen dan Hasil Uji Kualitas Pasangan Primer gen Gag HIV-1

Pasangan Primer	Panjang Primer (basa)	Ukuran fragment (bp)	Kandungan GC (%)	Tm (°C)	Repeat and runs	Struktur sekunder
<i>Forward</i> 5'- GACATCAAGCAGCCATGC-3'	18	93	55	56	No	No
<i>Reverse</i> 3'- CCAATCCAGGACGTACGTG-5'	19		57	58	No	

Tabel 2. Sekuen dan Hasil Uji Kualitas Probe gen Gag HIV-1

<i>Probe</i>	Panjang Primer (basa)	Ukuran fragment (bp)	Kandungan GC (%)	<i>Tm</i> (°C)	<i>Repeat and runs</i>	Struktur sekunder
<i>Probe</i> 5'- GGAAGCTGCAGAATGGGACAG-3'	21	93	57	66	No	No

Berdasarkan pengujian kemungkinan terjadinya reaksi silang (*avoid cross homology*) dengan organisme selain HIV-1, sekuen pasangan primer dan probe gen Gag HIV-1 menunjukkan homologi 100% dengan HIV-1 yang dapat dilihat pada gambar 2 hingga Gambar 4.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">HIV-1 isolate GX19032 from China .partial genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8887	<a href="#">OQ696751</a>
<a href="#">HIV-1 isolate GX19017 from China .partial genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8846	<a href="#">OQ696756</a>
<a href="#">Tetrademus obliquus strain DOE0152z chromosome 4a</a>	<a href="#">Tetrademus obl...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	7755718	<a href="#">CP126194</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-E04-TAOK1 from Belgium nonfunctional gag.protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	4756	<a href="#">OQ596930</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C06-KANSL1 from Belgium gag.protein (gag).gene_complete cds...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	5112	<a href="#">OQ596927</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C02-TAOK1 from Belgium nonfunctional gag.protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8499	<a href="#">OQ596920</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G08 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9087	<a href="#">OQ596958</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G07-PTEN from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9098	<a href="#">OQ596957</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-C06-MGAT4A from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9085	<a href="#">OQ596947</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MCB-B08-KIF1B from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9055	<a href="#">OQ596938</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MCB-B07-Chr22-36444750 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596934</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-D05 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9045	<a href="#">OQ596928</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-D02-Chr22-36444750 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596928</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C09-Chr22-36444750 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596928</a>
<a href="#">HIV-1 isolate CIS06042-V1-CD4-26 from Belgium .complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9043	<a href="#">OQ596841</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G04-LOC100506639 from Belgium nonfunctional gag.protein (gag).ge...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8683	<a href="#">OQ596956</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G03 from Belgium gag.protein (gag).gene_complete cds_pol.protein (p...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9060	<a href="#">OQ596955</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-F07-RABGAP1 from Belgium nonfunctional gag.protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8880	<a href="#">OQ596954</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-F05-SLC6A16 from Belgium gag.protein (gag).gene_complete cds_pol...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9013	<a href="#">OQ596955</a>

Gambar 2. Hasil Pensejajaran Sekuen Forward Primer Gen Gag HIV-1 dengan BLAST NCBI

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">HIV-1 isolate GX19032 from China, partial genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8887	<a href="#">OQ696751</a>
<a href="#">HIV-1 isolate GX19017 from China, partial genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8846	<a href="#">OQ696750</a>
<a href="#">Tetrademus obliquus strain DOE0152z chromosome 4a</a>	<a href="#">Tetrademus obl...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	7755718	<a href="#">CP126194.1</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-E04-TAOK1 from Belgium nonfunctional gag protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	4756	<a href="#">OQ596930</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C06-KANSL1 from Belgium gag protein (gag).gene_complete cds:...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	5112	<a href="#">OQ596922</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C02-TAOK1 from Belgium nonfunctional gag protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8499	<a href="#">OQ596920</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G08 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9087	<a href="#">OQ596958</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G07-PTEN from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9098	<a href="#">OQ596957</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-C06-MGAT4A from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9085	<a href="#">OQ596947</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MCB-B08-KIF1B from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9055	<a href="#">OQ596935</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MCB-B07-Chr22-36444750 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596934</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-D05 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9045	<a href="#">OQ596928</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-D02-Chr22-36444750 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596926</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC008-HG-MBJ-C09-Chr22-36444750 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9058	<a href="#">OQ596925</a>
<a href="#">HIV-1 isolate CIS06042-V1-CD4-26 from Belgium complete genome</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9043	<a href="#">OQ596841</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G04-LOC100506639 from Belgium nonfunctional gag protein (gag).ge...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8683	<a href="#">OQ596956</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-G03 from Belgium gag protein (gag).gene_complete cds: pol protein (p...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9060	<a href="#">OQ596955</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-F07-RABGAP1 from Belgium nonfunctional gag protein (gag).gene_co...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	8880	<a href="#">OQ596954</a>
<a href="#">HIV-1 isolate STIPSEQ-MRC021-MDW-F05-SLC6A16 from Belgium gag protein (gag).gene_complete cds: pol...</a>	<a href="#">Human immuno...</a>	36.2	36.2	100%	34	100.00%	9013	<a href="#">OQ596952</a>

**Gambar 3.** Hasil Pensejajaran Sekuen Reverse Primer Gen Gag HIV-1 dengan BLAST NCBI

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Melanotus villosus genome assembly_chromosome_X</a>	<a href="#">Melanot...</a>	NA	346801	38.2	38.2	100%	8.6	100.00%	43658339	<a href="#">OY720427.1</a>
<a href="#">Dryomyza anilis genome assembly_chromosome_X</a>	<a href="#">Dryomy...</a>	NA	169445	38.2	38.2	100%	8.6	100.00%	82254885	<a href="#">OX638135.1</a>
<a href="#">Chionomys nivalis genome assembly_chromosome_15</a>	<a href="#">Chiono...</a>	Europea...	269649	38.2	38.2	100%	8.6	100.00%	71441066	<a href="#">OX465463.1</a>
<a href="#">Bruchidius silligastri genome assembly_chromosome_X</a>	<a href="#">Bruchidi...</a>	NA	1649775	38.2	38.2	100%	8.6	100.00%	22912655	<a href="#">OX438538.1</a>
<a href="#">Acomys russatus genome assembly_chromosome_16</a>	<a href="#">Acomys...</a>	golden s...	60746	38.2	38.2	100%	8.6	100.00%	47487087	<a href="#">LR877227.1</a>
<a href="#">Felis catus Senuz DNA_chromosome_D2_American Shorthair breed</a>	<a href="#">Felis cat...</a>	domesti...	9685	36.2	36.2	94%	34	100.00%	90643714	<a href="#">AP023162.1</a>
<a href="#">Pseudochaenichthys georgianus genome assembly_chromosome_15</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	South G...	52239	36.2	36.2	94%	34	100.00%	39528010	<a href="#">LR792560.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7181	<a href="#">XM_032768687</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7226	<a href="#">XM_032768686</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7229	<a href="#">XM_032768685</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7235	<a href="#">XM_032768684</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7286	<a href="#">XM_032768683</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7292	<a href="#">XM_032768682</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7295	<a href="#">XM_032768681</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7334	<a href="#">XM_032768680</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7337	<a href="#">XM_032768679</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7397	<a href="#">XM_032768678</a>
<a href="#">PREDICTED: Chelonoidis abingdonii multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex c...</a>	<a href="#">Chelono...</a>	Abingdo...	106734	36.2	36.2	94%	34	100.00%	7397	<a href="#">XM_032768677</a>

**Gambar 4.** Hasil Pensejajaran Sekuen Probe Gen Gag HIV-1 dengan BLAST NCBI

## DISKUSI

Pada pengujian kualitas sekuen pasangan primer gen Gag HIV-1 diperoleh hasil yang baik dan sesuai dengan persyaratan untuk qRT-PCR (Tabel 1). Sekuen primer forward memiliki panjang 18 basa, sedangkan sekuen reverse sepanjang 19 basa. Panjang sekuen pasangan primer tersebut memenuhi syarat yaitu antara 15-30 pasang basa (Rodríguez *et al.*, 2015). Primer yang memiliki panjang kurang

atau lebih dari basa yang dipersyaratkan dapat menyebabkan penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan atau tidak spesifik (*mispriming*) (Sasmitha, Yustiantara and Yowani, 2018).

Efisiensi PCR sangat ditentukan oleh jumlah basa pada sekuen primer. Primer yang baik mempunyai persentase G dan C sekitar 40-60% (Saraswati and Dwi Wahyuni, 2019). Komponen GC memenuhi persyaratan komponen basa sekuen primer reverse yaitu sebesar 57%, begitu pula sekuen forward primer sebesar 55% memenuhi standar. Basa G dan C memiliki 3 ikatan hidrogen sehingga memiliki ikatan yang lebih kuat dan lebih stabil dibandingkan basa adenin (A) dan timin (T) yang hanya diikat oleh 2 ikatan hidrogen. Jumlah GC yang terlalu tinggi dapat menghambat proses pemisahan untai ganda pada DNA template dan primer, namun jumlah GC yang terlalu rendah pada primer menyebabkan primer tidak mampu menempel secara efektif pada DNA target sehingga akan menurunkan efisiensi proses PCR (Sasmitha, Yustiantara and Yowani, 2018).

Hasil pengujian menunjukkan  $T_m$  primer *forward* sebesar  $56^{\circ}\text{C}$ , lebih rendah  $2^{\circ}\text{C}$  dibandingkan primer *reverse* yang memiliki nilai  $T_m$   $58^{\circ}\text{C}$ . Nilai  $T_m$  primer dan selisih  $T_m$  antara pasangan primer telah memenuhi persyaratan, yaitu antara  $50-65^{\circ}\text{C}$  dengan selisih  $T_m$  tidak lebih dari  $5^{\circ}\text{C}$ .  $T_m$  penting ditentukan karena menjadi acuan suhu yang digunakan dalam menentukan suhu *annealing* ( $T_a$ ).  $T_m$  yang lebih tinggi dari  $65^{\circ}\text{C}$  dapat mengurangi efektifitas *annealing* yang menyebabkan amplifikasi DNA berjalan kurang maksimal. Lebih lanjut, selisih  $T_m$  lebih dari  $5^{\circ}\text{C}$  dapat mengakibatkan penurunan proses amplifikasi, bahkan memungkinkan proses amplifikasi tidak berlangsung (Sasmitha, Yustiantara and Yowani, 2018).

Pasangan primer menghasilkan amplifikasi PCR dengan ukuran amplicon sepanjang 93 pasang basa. Panjang amplicon memenuhi persyaratan optimal untuk kuantitatif PCR (qPCR) yaitu dalam kisaran 50-150 pasang basa. Amplicon yang lebih pendek beramplifikasi lebih efisien dibandingkan amplicon yang lebih panjang dan lebih toleran terhadap kondisi reaksi suboptimal (Rodríguez *et al.*, 2015). Selain itu, pada sekuen pasangan primer tidak ditemukan pengulangan urutan basa (*repeat and runs*) yang berlebihan. Pengulangan basa lebih dari tiga



basa dapat mengakibatkan terbentuknya struktur *hairpin*, yaitu kondisi dimana ujung-ujung primer saling berkomplemen. *Hairpin* pada primer ini harus dihindari. Sekuen pasangan primer dan probe juga tidak memiliki urutan basa dengan pengulangan terus-menerus sehingga dapat dikatakan bahwa primer dan probe memenuhi persyaratan (Tabel 1 dan Tabel 2). Pengulangan basa G atau C tiga kali atau lebih dapat mengakibatkan kesalahan penempelan primer (*false priming*) pada proses amplifikasi (Saraswati and Dwi Wahyuni, 2019).

Hasil uji kemungkinan terbentuknya struktur sekunder dengan menggunakan Perl primer menunjukkan tidak terbentuknya *hairpin loop* dan dimer pada sekuen pasangan primer maupun probe yang ditunjukkan dengan besar energi untuk memecah struktur *hairpin* ( $\Delta G$ ) pada ujung 3' lebih kecil dari -3 kcal/mol. Terbentuknya struktur sekunder pada primer maupun probe dapat menghalangi penempelan primer pada DNA template (Rodríguez *et al.*, 2015).

Pada pengujian kualitas sekuen probe gen Gag HIV-1 diperoleh hasil yang baik dan sesuai dengan persyaratan untuk qRT-PCR (Tabel 2). Probe dirancang untuk mengikat salah satu untai target, berada dekat dengan forward dan reverse primer, namun tidak tumpang tindih dengan tempat pengikatan primer pada untai yang sama. Panjang sekuen probe diperoleh 21 basa, dengan komponen GC sebanyak 57% seperti halnya komponen GC pada primer, serta  $T_m$  66°C yang lebih tinggi dari  $T_m$  pasangan primer sehingga memenuhi standard sebagai probe. Pada Sekuen probe juga tidak terjadi pengulangan 2 basa lebih dari 4 kali dan tidak terjadi pengulangan basa lebih dari 4 kali serta tidak terbentuk struktur sekunder yang dapat mempengaruhi proses annealing dan hasil amplifikasi qRT-PCR (Rodríguez *et al.*, 2015).

Hasil uji homologi menunjukkan pasangan primer dan probe gen Gag HIV-1 memiliki homologi 100% dengan HIV-1 (Gambar 2, 3, dan 4). Hal ini juga dapat diartikan bahwa tidak terdapat kemungkinan terjadinya reaksi silang (*avoid cross homology*) antara primer dan probe dengan organisme selain HIV-1. Dengan demikian, primer dan probe memenuhi persyaratan.

## KESIMPULAN

Sekuen pasangan primer dan probe gen *Gag* HIV-1 yang diperoleh adalah 5'-GACATCAAGCAGCCATGC-3' (*forward*), 3'-CCAATCCAGGACGTACGTG-3' (*reverse*), dan 5'-GGAAGCTGCAGAATGGGACAG-3' (*probe*). Hasil uji kualitas dan uji homologi menunjukkan sekuen pasangan primer dan probe memenuhi syarat dan dapat digunakan untuk amplifikasi gen *Gag* HIV-1 menggunakan qRT-PCR.

Perlu dilakukan uji sensitifitas dan spesifisitas pada sekuen pasangan primer dan probe serta pengujian menggunakan sampel klinis.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada UP2M STIKES Bina Cipta Husada Purwokerto atas segala fasilitas yang diberikan sehingga riset ini dapat terselesaikan dengan tepat waktu.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan.

## REFRENSI

- Effendi, I. (2019) 'Pemeriksaan Molekular *Treponema pallidum*', *Jurnal Kedokteran Meditek*, 24(68). doi: 10.36452/jkdoktmeditek.v24i68.1706.
- Kapaata, A. *et al.* (2021) 'Hiv-1 gag-pol sequences from ugandan early infections reveal sequence variants associated with elevated replication capacity', *Viruses*, 13(2), pp. 1-14. doi: 10.3390/v13020171.
- Liu, Y. *et al.* (2017) 'HIV-1 Sequence Necessary and Sufficient to Package Non-viral RNAs into HIV-1 Particles', *Journal of Molecular Biology*, 429(16), pp. 2542-2555. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.018.
- Marie, V. and Gordon, M. L. (2022) 'The HIV-1 Gag Protein Displays Extensive Functional and Structural Roles in Virus Replication and Infectivity', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), pp. 1-15. doi: 10.3390/ijms23147569.
- Rodríguez, A. *et al.* (2015) 'Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods', 1275, pp. 31-56. doi: 10.1007/978-3-030-03389-7\_14.
- Saraswati, H. and Dwi Wahyuni, F. (2019) 'Desain Primer Secara In Silico untuk

Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal', *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), pp. 33-38.

Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S. and Yowani, S. C. (2018) 'Desain DNA Primer secara In Silico sebagai Pendeteksi Mutasi Gen gyrA *Mycobacterium tuberculosis* untuk Metode Polimerase Chain Reaction', *CAKRA KIMIA (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 6(1), pp. 63-69.

Waheed, A. A. and Freed, E. O. (2012) 'HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy', *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28(1), pp. 54-75. doi: 10.1089/aid.2011.0230.

Wibowo, H. A., Setiawaty, V. and Salwati, E. (2011) 'EPIDEMOLOGI MOLEKULER GENOTIPE Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) PADA ORANG DENGAN HIV/AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) atau ODHA di JAWA TIMUR DAN DKI JAKARTA', *Bul. Penelit. Kesehat*, 3(1), pp. 1-9.

---