

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. *Klebsiella pneumoniae*

1. Klasifikasi taksonomi *Klebsiella pneumoniae*



Gambar 1 Bakteri *Klebsiella
Pneumoniae*

Sumber : Science Photo Library

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri yang termasuk kedalam kelompok *Enterobacteriaceae*, sehingga penetapan klasifikasi taksonomi menjadi dasar dalam memahami karakter biologis, patogenitas, serta perannya sebagai penyebab infeksi klinis. Menurut MicrobeWiki (2017), klasifikasi taksonomi *Klebsiella pneumoniae* sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Proteobacteria*
Kelas : *Gammaproteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Klebsiella*
Spesies : *Klebsiella pneumoniae*

2. Morfologi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pertama kali ditemukan oleh Edwin Klebs pada tahun 1875 dan diisolasi dari saluran pernafasan pasien yang meninggal karena pneumonia. Kemudian bakteri ini dideskripsikan oleh Carl Friedländer seorang patologis dan mikrobiologis yang berasal dari Jerman pada tahun 1882. Berkat jasanya, *Klebsiella pneumoniae* sering disebut bakteri Friedländer (Rahmawati, 2009).

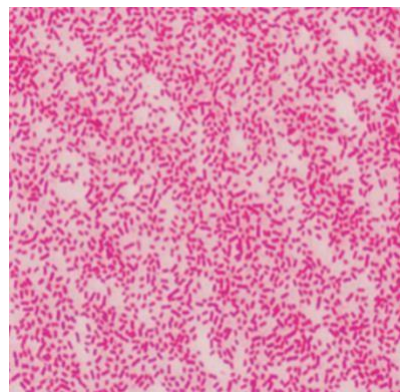
Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri dengan golongan gram negatif yang memiliki genom aksesori besar plasmid dan lokus gen kromosom. Genom aksesori membagi *Klebsiella pneumoniae* strain menjadi kelompok oportunistik, hipervirulen, dan resistan terhadap berbagai obat. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* ini memiliki ukuran 1,2 μm x 0,5 μm , berbentuk batang (basil) dan tidak menghasilkan spora (Umarudin dkk., 2023). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* tergolong bakteri yang tidak dapat melakukan pergerakan (non motil). Berdasarkan kebutuhan oksigennya, *Klebsiella pneumoniae* termasuk dalam kelompok bakteri fakultatif anaerob, yaitu dapat hidup baik dengan maupun tanpa oksigen. Bakteri ini mampu memfermentasi laktosa, menunjukkan hasil negatif pada uji indol, serta memiliki kemampuan mereduksi nitrat (Rahmawati, 2009).

Ciri morfologi khas *Klebsiella pneumoniae* terlihat jelas ketika ditumbuhkan pada media padat secara in vitro, meskipun bentuknya dapat sangat bervariasi ketika ditemukan pada sampel klinis. Secara umum, bakteri ini memiliki kapsul yang besar dan teratur, sehingga memberikan tampilan lendir yang tebal. Koloninya biasanya berukuran besar, berwarna merah jambu, tampak sangat mukoid, dan cenderung menyatu selama proses inkubasi. *Klebsiella pneumoniae* termasuk

anggota famili *Enterobacteriaceae* dan merupakan salah satu bakteri yang dapat menjadi penyebab terjadinya pneumonia. *Klebsiella pneumoniae* dapat berkembang dengan baik dalam kondisi aerob, pada rentang suhu antara 12°C hingga 43°C, dengan suhu optimal pertumbuhan berada pada kisaran 35°C – 37°C. Di bawah kondisi anaerob, pertumbuhannya cenderung minimal. Adapun pH yang paling sesuai untuk pertumbuhan bakteri ini adalah sekitar 7,2 (Rahmawati, 2009).



Gambar 2 Koloni *Klebsiella pneumoniae* Pada Media *MacConkey Agar*



Gambar 3 Bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada pemeriksaan gram

Sumber : Sulaiman dkk., (2025)

Sumber : Researchgate

3. Klasifikasi berdasarkan antigen

Pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*, terdapat dua jenis antigen yang dapat meningkatkan faktor virulensi, yaitu antigen O berupa lipopolisakarida berulang yang stabil terhadap panas dan alkohol, serta antigen K, yaitu kapsul polisakarida yang menutupi antigen O dan berperan penting dalam patogenisitas bakteri (Kesuma, Wahyuni dan Azahra, 2023).

4. Patogenitas bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri oportunistik yang umumnya menginfeksi individu dengan daya tahan tubuh rendah dan sering menjadi penyebab

infeksi nosokomial. Beberapa serotipe *Klebsiella pneumoniae* yang bersifat hipervirulen mampu memproduksi kapsul polisakarida dalam jumlah lebih tinggi sehingga dapat menginfeksi orang yang sehat sebelumnya dan menimbulkan infeksi komunitas yang berat, termasuk abses hati piogenik, meningitis, fasitis nekrotikans, endoftalmitis, serta pneumonia parah. Dalam proses infeksi, *Klebsiella pneumoniae* memanfaatkan beragam faktor virulensi di antaranya kapsul polisakarida, lipopolisakarida, fimbria, protein membran luar, serta berbagai mekanisme untuk memperoleh zat besi dan memanfaatkan sumber nitrogen yang memungkinkan bakteri bertahan hidup, berkembang biak, dan menghindari sistem imun inang (Li et al., 2014).

B. Gen β -Lactamase Sulphydryl Variabel (blaSHV)

1. Pengertian Gen β -Lactamase Sulphydryl Variabel (blaSHV)

Gen blaSHV merupakan salah satu gen yang mengkode β -laktamase kelas A, yaitu enzim yang mampu memecah cincin β -laktam dari antibiotik golongan β -laktam, seperti penisilin dan sefalosporin, sehingga antibiotik menjadi tidak aktif. Mutasi pada gen ini dapat menghasilkan varian dengan spektrum lebih luas yang dikenal sebagai *extended-spectrum β -lactamases* (ESBL), yang mampu memecah sefalosporin generasi ketiga seperti cefotaxime dan ceftazidime. Dalam studi terbaru, gen blaSHV dilaporkan sebagai salah satu gen ESBL yang tetap terdeteksi pada isolat klinis meskipun prevalensinya kini sering lebih rendah dibanding gen blaCTX-M di banyak lokasi, tetapi tetap signifikan secara klinis karena kontribusinya terhadap resistensi β -laktam pada Enterobacteriaceae (Ali et al., 2025).

2. Mekanisme resistensi Gen β -Lactamase Sulphydryl Variabel (blaSHV)

Gen *β -Lactamase Sulphydryl Variable* (blaSHV) menimbulkan resistensi antibiotik melalui mekanisme produksi enzim *β -laktamase* yang mampu menghidrolisis cincin β -laktam pada antibiotik, sehingga antibiotik kehilangan aktivitas bakteri. Enzim SHV bekerja dengan memutus ikatan amida pada struktur β -laktam, khususnya pada penisilin dan sefalosporin, dan pada varian ESBL mampu menginaktivasi sefalosporin generasi ketiga seperti cefotaxime dan ceftazidime. Mekanisme resistensi ini diperkuat oleh mutasi titik pada gen blaSHV, terutama pada daerah aktif enzim yang menyebabkan perubahan konformasi enzim sehingga spektrum hidrolisisnya menjadi lebih luas. Selain itu, lokasi gen blaSHV yang umumnya berada pada plasmid memungkinkan terjadinya transfer gen horizontal antar bakteri, sehingga resistensi dapat menyebar dengan cepat di lingkungan klinis (Castanheira, Simner, and Bradford, 2021).

C. *Extended-Spectrum β -Lactamase* (ESBL)

1. Definisi *Extended-Spectrum β -Lactamase* (ESBL)

Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) merupakan enzim yang diproduksi oleh bakteri tertentu yang mampu menghidrolisis dan menonaktifkan antibiotik golongan sefalosporin dan berbagai antibiotik *β -laktam* seperti ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, serta oksiiimino-monobaktam. Enzim ini menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap kelompok antibiotik tersebut, sehingga menyulitkan terapi infeksi dan sering dikaitkan dengan peningkatan angka kegagalan pengobatan (Ghafourian et al., 2015). Bakteri yang umumnya menghasilkan enzim ESBL yaitu bakteri dengan gram negatif seperti *Klebsiella pneumonia*, *Eschericia coli*, *Acinetobacter*, *Citobacter*, *Enterobacter*,

Pseudomonas, Salmonella, dan Seratia spp (Armabar, Iswahyudi dan Ropiqa, 2024).

2. Mekanisme resistensi *Extended-Spectrum β -Lactamase* (ESBL)

Bakteri Gram-negatif mampu menonaktifkan aktivitas antibiotik β -laktam melalui berbagai mekanisme. Pada ruang periplasma, bakteri ini menghasilkan enzim β -laktamase yang dapat berikatan dengan antibiotik β -laktam dengan afinitas yang lebih tinggi dibandingkan afinitas antibiotik tersebut terhadap target kerjanya, sehingga antibiotik menjadi tidak efektif. Gen yang mengode β -laktamase dapat berada pada kromosom bakteri yang bersifat stabil, atau sering ditemukan pada spesies seperti *Enterobacter* yang berada pada kromosom genetik imobil seperti plasmid, integron, dan transposon. Gen penyebab resistensi dapat muncul melalui mutasi pada tingkat gen maupun melalui perolehan gen resisten dari bakteri lain, baik dari spesies yang sama maupun berbeda (Armabar, Iswahyudi dan Ropiqa, 2024).

Integron, yang pertama kali dijelaskan pada akhir 1980-an, bertindak sebagai wadah yang memfasilitasi perpindahan gen resistensi antar bakteri, baik dalam satu spesies maupun lintas spesies, melalui pengambilan kaset gen yang terdapat pada transposon atau plasmid konjugatif. Proses ini terjadi melalui mekanisme transfer gen horizontal seperti transformasi, transduksi, atau konjugasi. Gen penyandi β -laktamase tipe TEM umumnya dibawa dan disebarkan oleh transposon seperti Tn1, Tn2, dan Tn3, sementara gen β -laktamase tipe SHV dapat ditemukan pada kromosom maupun plasmid. Untuk β -laktamase tipe CTX-M, penyebaran melalui konjugasi menjadi mekanisme yang paling sering diamati. Hingga kini, setidaknya lima kelas integron intI1, intI2, intI3, intI4, dan intI5, telah diidentifikasi berperan

penting dalam penyebaran gen resistensi antibiotik (Armabar, Iswahyudi dan Ropiqa, 2024).

Penggunaan inhibitor β -laktamase dapat menghambat aktivitas enzim ESBL dan membantu mencegah kerusakan antibiotik β -laktam. Namun, perlu diperhatikan bahwa beberapa β -laktamase tidak dapat dinonaktifkan oleh inhibitor tradisional seperti asam klavulanat, sulbaktam, maupun tazobaktam. Selain produksi β -laktamase, resistensi pada bakteri Gram-negatif juga dapat disebabkan oleh berkurangnya permeabilitas membran luar akibat mutasi genetik, yang membatasi masuknya antibiotik ke dalam sel, serta meningkatnya aktivitas pompa efluks yang mengeluarkan antibiotik dari periplasma ke lingkungan luar sel (Armabar, Iswahyudi dan Ropiqa, 2024).

D. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat diidentifikasi dengan metode konvensional seperti penanaman kultur pada media agar (Labunda, Fatayati dan Slamet, 2024). Namun, dalam penerapan metode ini memerlukan alur pemeriksaan yang cukup panjang sehingga membutuhkan waktu dan sumber daya yang lebih banyak dan terampil. Metode molekuler dapat menjadi alternatif yang menjanjikan dalam usaha konservasi. Adanya metode molekuler memberikan hasil yang akurat dan dapat dijadikan diagnosis dalam aplikasi klinis. Salah satu metode berbasis molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction (PCR)* yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Latuhary, Fatimawali dan Kolondam, 2018).

1. Definisi PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode molekuler yang bertujuan untuk memperbanyak fragmen spesifik DNA dari template DNA, dengan prinsip

replikasi utas ganda DNA spesifik secara *in vitro* hingga menjadi jutaan salinan dalam waktu yang singkat. Teknik PCR melewati 3 rangkaian fase siklus temperatur yaitu : fase denaturasi, fase annealing, dan fase ekstensi. Teknik ini sering digunakan untuk mendeteksi materi genetik seperti virus atau bakteri penyebab penyakit serta dalam bidang lain seperti forensik dan rekayasa genetika (Yusuf, 2010).

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama dalam reaksi seperti DNA Template, Oligonukleotida primer, *Deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP), DNA Polimerase. Selain komponen utama, ada beberapa komponen pendukung lain yang diperlukan dalam reaksi PCR seperti Larutan buffer PCR, Magnesium klorida ($MgCl_2$) (Yusuf, 2010). Untuk mendapatkan hasil PCR yang maksimal, diperlukan optimasi reaksi PCR dengan memperhatikan faktor-faktor penting meliputi jenis polimerase DNA, durasi dan suhu siklus, komposisi buffer PCR, serta konsentrasi dNTP dan $MgCl_2$ (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2. Prinsip umum PCR

Teknik PCR merupakan proses yang melibatkan beberapa tahap berulang dan pada setiap siklusnya terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. DNA *template* beruntai ganda (*unamplified* DNA) terlebih dahulu dipisahkan menjadi dua untai melalui proses denaturasi pada suhu tinggi. Setelah itu, suhu diturunkan ke tingkat tertentu agar primer dapat berikatan (*annealing*) pada lokasi spesifik di DNA target. Pada tahap berikutnya, enzim DNA polimerase memperpanjang primer tersebut (*extension*) dengan memanfaatkan dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) dalam kondisi buffer yang sesuai. Proses ini biasanya diulang selama 20 hingga 40 siklus. Seiring berjalannya siklus, fragmen DNA target berukuran pendek

akan mengalami peningkatan jumlah secara eksponensial mulai sekitar siklus keempat, sedangkan fragmen DNA non-target (produk panjang) hanya bertambah secara linier (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. Tahapan dalam PCR

Proses PCR terdiri dari beberapa langkah utama (Handoyo dan Rudiretna, 2001), yaitu:

- a. *Pre-denaturation*, yakni tahap awal untuk memisahkan struktur DNA *template*.
- b. *Denaturation*, yaitu pemutusan heliks ganda DNA sehingga kedua untainya terpisah.
- c. *Annealing*, yaitu fase ketika primer menempel pada urutan komplementer di DNA *template*.
- d. *Extension*, yaitu proses pemanjangan primer oleh enzim polimerase.
- e. *Post-extension*, yaitu tahap akhir untuk menstabilkan hasil amplifikasi.

E. Desain Primer

Keberhasilan proses PCR dapat dipengaruhi oleh primer yang digunakan. Oligonukleotida primer (desain primer) memiliki peran yang sangat krusial dalam menentukan tingkat spesifisitas dan efisiensi PCR. Primer yang dirancang dengan baik akan memastikan bahwa amplifikasi hanya terjadi pada segmen DNA target yang diinginkan, sekaligus meminimalkan amplifikasi non-spesifik. Dalam perancangan untuk memperoleh sebuah primer yang memenuhi kriteria primer yang baik dilakukan secara *in silico* yaitu merancang menggunakan bantuan program dalam komputer (Pradnyaniti, Wirajana dan Yowani, 2010). Dalam perancangan desain primer, dapat dilakukan menggunakan informasi urutan DNA yang sudah tersedia maupun berdasarkan urutan protein target. Data sekuens DNA atau protein

tersebut umumnya dapat diakses melalui database seperti *GenBank*. Jika urutan DNA atau protein yang ingin diamplifikasi belum tersedia, maka primer dapat dirancang dengan memanfaatkan analisis homologi dari sekuens DNA atau protein lain yang memiliki kedekatan kekerabatan dengan organisme atau gen target (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Selain itu, karakteristik primer seperti panjang pasangan basa, suhu leleh (T_m), kandungan GC, struktur sekunder (misalnya hairpin atau dimer), serta posisi penempelan pada urutan target menjadi faktor yang harus diperhatikan saat melakukan desain primer untuk memperoleh hasil PCR yang optimal (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

1. Panjang Primer

Desain primer yang diperlukan dalam proses PCR adalah sepasang primer yaitu primer forward dan primer reverse (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014). Secara umum, primer dirancang dengan panjang antara 18 hingga 30 basa. Primer yang memiliki panjang kurang dari 18 basa cenderung memiliki spesifisitas rendah. Primer yang terlalu pendek lebih mudah mengalami *mispriming*, yaitu menempel pada lokasi DNA yang tidak sesuai, sehingga dapat menurunkan ketepatan pengikatan primer dan berdampak negatif pada efektivitas serta efisiensi reaksi PCR. Sebaliknya, primer yang berukuran lebih dari 30 basa biasanya tidak memberikan peningkatan spesifisitas yang berarti, bahkan dapat menyebabkan peningkatan biaya tanpa keuntungan signifikan terhadap performa PCR, selain itu primer yang panjang dapat berakibat terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2. *Temperature melting (T_m)*

Temperature melting (T_m) merupakan suhu ketika 50% struktur DNA beruntai ganda mengalami pemisahan menjadi dua untai tunggal. Penentuan nilai T_m pada sebuah primer sangat penting karena akan memengaruhi pemilihan suhu annealing dalam reaksi PCR. Nilai T_m sendiri dipengaruhi oleh komposisi basa serta panjang primer. Secara teori, T_m dapat dihitung menggunakan rumus sederhana $[2(A+T) + 4(C+G)]$ di mana A, T, C, dan G masing-masing menyatakan jumlah basa adenin, timin, sitosin, dan guanin. Angka 2 dan 4 merupakan nilai empiris yang menunjukkan kontribusi suhu dari pasangan basa, di mana pasangan A – T dengan dua ikatan hidrogen memberikan kontribusi sekitar 2°C, sedangkan pasangan C – G dengan tiga ikatan hidrogen memberikan kontribusi sekitar 4°C karena stabilitasnya lebih tinggi. Idealnya, primer memiliki nilai T_m dalam rentang 50 - 65°C agar proses annealing berlangsung optimal (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. *Selisih Melting temperature (ΔT_m)*

Perbedaan titik leleh antara primer *forward* dan *reverse* sebaiknya tidak terlalu besar. Jika selisih T_m kedua primer melebihi 5°C, efisiensi amplifikasi dapat menurun secara signifikan, bahkan dalam beberapa kasus reaksi PCR mungkin gagal menghasilkan amplifikasi sama sekali (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

4. *Secondary structures*

Dalam reaksi PCR, keberadaan struktur sekunder seperti hairpin maupun dimer sebaiknya dihindari. Struktur sekunder tersebut dipengaruhi oleh nilai energi bebas (ΔG) serta titik lelehnya. Jika terbentuk, struktur ini dapat menghambat primer

untuk berikatan dengan DNA template (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

a. Hairpin

Hairpin merupakan struktur yang terbentuk ketika urutan basa pada satu untai DNA atau RNA saling berpasangan secara komplementer, sehingga membentuk loop. Pembentukan hairpin pada primer harus diminimalkan karena dapat mengganggu proses annealing, meskipun pada praktiknya sulit mendapatkan primer yang benar-benar bebas dari struktur ini. Hairpin yang berada di ujung 3' dengan nilai delta G (ΔG) sekitar -2 kcal/mol dan hairpin internal dengan ΔG sekitar -3 kcal/mol masih dianggap dapat ditoleransi. Selain itu, disarankan agar primer tidak memiliki basa T pada ujung 3', karena keberadaan basa tersebut dapat meningkatkan peluang *mismatch*. Jumlah *mismatch* yang tinggi, terutama pada ujung 3' primer, juga dapat mendorong terbentuknya struktur hairpin (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

b. *Self-Dimer* dan *Cross-Dimer*

Self-dimer terjadi ketika suatu primer berikatan dengan dirinya sendiri. Struktur ini dapat terbentuk baik pada ujung 3' maupun pada bagian internal primer. *Self-dimer* pada ujung 3' dengan nilai ΔG sekitar -5 kcal/mol dan *self-dimer* internal dengan ΔG sekitar -6 kcal/mol masih dianggap dalam batas toleransi.

Sementara itu, *cross-dimer* terbentuk ketika primer forward berpasangan dengan primer reverse. Nilai ΔG untuk *cross-dimer* pada ujung 3' sekitar -5 kcal/mol dan untuk bagian internal sekitar -6 kcal/mol masih dapat diterima tanpa terlalu mengganggu proses amplifikasi (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

5. *Repeats & Runs*

Urutan basa yang berulang atau homopolimer dalam jumlah panjang, terutama lebih dari tiga nukleotida yang sama secara berurutan (misalnya pada sekuens AGCGGGGGATG yang memiliki lima basa G berturut-turut), sebaiknya dihindari. Pola seperti ini dapat menyebabkan fenomena *breathing* pada primer dan meningkatkan risiko mispriming, sehingga proses annealing menjadi kurang efisien. Selain itu, primer juga tidak dianjurkan memiliki pola pengulangan dua basa secara berulang, pengulangan pasangan basa hingga empat kali masih dianggap dapat ditoleransi, seperti pada motif ATATATAT. Keberadaan pola repetitif seperti ini turut meningkatkan kemungkinan terbentuknya struktur hairpin (Sasmito, Kurniawan dan Muhimmah, 2014).

F. Perangkat Lunak Perancangan Primer

1. Uji *In Silico*

Pendekatan *in silico* dalam perancangan primer merujuk pada penggunaan perangkat lunak dan analisis komputasi untuk merancang, mengevaluasi, dan memprediksi kinerja pasangan primer sebelum dilakukan uji laboratorium (*in vitro*). Metode ini dimulai dengan pengambilan sekuens target dari basis data seperti GenBank, kemudian primer dirancang dengan mempertimbangkan parameter teknis seperti panjang nukleotida, kandungan GC, suhu leleh (T_m), serta kemungkinan struktur sekunder yang dapat mengganggu fungsi primer. Hasil desain tersebut kemudian diuji secara *in silico* dengan simulasi PCR virtual untuk memprediksi produk amplifikasi, menentukan posisi pengikatan primer, dan memastikan spesifisitas terhadap template DNA target tanpa amplifikasi silang. Validasi ini biasanya dilakukan dengan menggunakan basis data genom melalui alat

seperti BLAST atau *software* khusus *in silico* PCR sehingga dapat memperkirakan apakah pasangan primer akan menghasilkan produk yang diharapkan dalam eksperimen nyata (Kumar dan Chordia, 2015).

Pendekatan *in silico* tak hanya meningkatkan efisiensi desain primer, tetapi juga menekan biaya dan waktu eksperimen, karena potensi kesalahan atau amplifikasi non-spesifik dapat diidentifikasi lebih awal melalui analisis komputer. Studi-studi sebelumnya telah membahas metode dan aplikasi *in silico* PCR dalam desain primer, termasuk penggunaan alat desain primer dan uji spesifisitas primer (*in silico*) yang kemudian dapat divalidasi secara eksperimental di laboratorium (Kumar dan Chordia, 2015).

2. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) merupakan pusat informasi bioteknologi yang berperan penting dalam mendukung penelitian biologi molekuler, khususnya dalam proses desain primer untuk reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Desain primer yang tepat merupakan faktor kunci keberhasilan PCR karena primer berfungsi sebagai titik awal sintesis DNA yang menentukan spesifisitas dan efisiensi amplifikasi gen target. NCBI menyediakan berbagai basis data sekuens genetik yang terstandarisasi dan diakui secara internasional, seperti GenBank dan *Reference Sequence* (RefSeq) (O’Leary et al., 2016). Basis data ini berisi informasi urutan DNA, RNA, dan protein dari berbagai organisme. Dalam proses perancangan desain primer diawali dengan mengambil sekuens gen target dari database NCBI sebagai cetakan (*template*) untuk menentukan daerah yang akan diamplifikasi. Ketersediaan data sekuens yang lengkap dan terkurasi menjadikan NCBI sebagai sumber utama dalam perancangan primer yang akurat dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah (NCBI, 2023).

Selain menyediakan data sekuens, NCBI juga mengembangkan alat bioinformatika yang secara khusus digunakan untuk desain primer, yaitu Primer-BLAST. Primer-BLAST merupakan kombinasi antara perangkat lunak Primer3 dan algoritma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Primer3 digunakan untuk merancang pasangan primer berdasarkan parameter tertentu, seperti panjang primer, suhu leleh (*melting temperature*), dan kandungan GC, sedangkan BLAST berfungsi untuk mengevaluasi spesifisitas primer terhadap seluruh sekuens yang terdapat dalam database NCBI. Dengan demikian, Primer-BLAST tidak hanya menghasilkan primer, tetapi juga memastikan bahwa primer tersebut tidak menempel pada sekuens non-target yang dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak diinginkan (NCBI, 2023).

3. Net Primer

NetPrimer merupakan perangkat lunak berbasis web yang digunakan untuk menganalisis karakteristik fisik dan kimia primer secara mendalam. Analisis yang dilakukan oleh NetPrimer meliputi perhitungan suhu leleh (*melting temperature*), kandungan GC, kemungkinan terbentuknya *hairpin*, *self-dimer*, maupun *cross-dimer* pada primer. Analisis pada NetPrimer sangat penting karena pembentukan struktur sekunder pada primer dapat menghambat proses penempelan primer pada DNA target dan menurunkan efisiensi amplifikasi PCR. Oleh karena itu, NetPrimer sering digunakan sebagai tahap evaluasi lanjutan setelah primer dirancang menggunakan database atau tools lain, seperti NCBI Primer-BLAST (Premier Biosoft, 2023).

4. Benchling

Benchling merupakan platform bioinformatika terpadu yang menyediakan fasilitas desain, analisis, dan manajemen data biologi molekuler. Dalam desain

primer, Benchling memungkinkan pengguna untuk merancang primer secara langsung dari sekuens DNA, sekaligus menganalisis parameter primer seperti panjang, suhu leleh, dan kandungan GC (Benchling, 2023). Selain itu, Benchling juga menyediakan fitur visualisasi sekuens dan anotasi gen, sehingga memudahkan peneliti dalam menentukan lokasi target amplifikasi secara lebih intuitif. Keunggulan Benchling dibandingkan tools desain primer konvensional adalah kemampuannya untuk mengintegrasikan desain primer dengan dokumentasi eksperimen laboratorium dalam satu platform. Hal ini mendukung keterlacakan (traceability) dan reproduktibilitas penelitian. Dengan demikian, penggunaan NetPrimer dan Benchling sebagai pelengkap NCBI dapat meningkatkan kualitas desain primer, baik dari segi spesifisitas, stabilitas, maupun efisiensi amplifikasi PCR (Ye et al., 2012).