Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

In Silico Evaluation and Experimental Assessment of a Primer Pair Intended for Candida albicans SAP4 Amplification

Tiara Khoirus Sholihah & Muhammad Taufiq Qurrohman*

Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia;

Article History
Received : October 29th, 2026
Revised : November 19th, 2026
Accepted : November 25th, 2026

*Corresponding Author:
Muhammad Taufiq Qurrohman,
Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia
Email: m.taufiqqurrohman@stikesnas.ac.id

Abstract: *Candida albicans* is an opportunistic fungal pathogen whose virulence is associated with secreted aspartyl proteinases (Saps). This study evaluated the physicochemical properties and in silico specificity of a primer pair targeting *SAP4* and identified a candidate annealing temperature using gradient PCR. The forward primer (5′-CCGTTGGTATTGGTGGTGTT-3′) and reverse primer (5′-AGGAACGGAAATCTTGAGG-3′) were designed to produce a 533-bp amplicon. Their GC contents were 50.00% and 47.37%, with melting temperatures of 58.39°C and 54.47°C, respectively. Secondary structure analysis indicated low hairpin and self-dimer potential, while the heterodimer (ΔG = −9.97 kcal/mol) warranted further consideration. Primer-BLAST predicted three 533-bp products corresponding to the *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* loci on chromosome 6 of strain SC5314. Gradient PCR (50.0–60.0°C) produced the main band at all temperatures, with faint additional bands at 50.0–53.8°C. A candidate annealing temperature of 56.1°C was selected based on band intensity, single-band appearance, and proximity to the mean primer melting temperature (56.4°C). However, the primer pair's specificity for *SAP4* alone remains unproven. Replicate testing, appropriate controls, and amplicon sequencing are required to confirm its specificity and product identity.

Keywords: *Candida albicans;* SAP4; Primer-BLAST; Primer specificity; PCR optimization.

Pendahuluan

Candida albicans merupakan salah satu spesies jamur yang secara normal dapat ditemukan sebagai mikroorganisme komensal pada permukaan mukosa manusia, termasuk rongga mulut, saluran gastrointestinal, dan saluran genital. Namun, perubahan kondisi tubuh dan gangguan keseimbangan antara pertahanan inang dan mikroorganisme dapat menyebabkan *C. albicans* berkembang menjadi patogen oportunistik. Kemampuan *C. albicans* untuk beradaptasi dengan lingkungan inang menjadi salah satu faktor yang mendukung transisinya dari organisme komensal menjadi penyebab infeksi (Lopes & Lionakis, 2022; Talapko *et al*., 2021).

Patogenesis *C. albicans* melibatkan berbagai faktor virulensi, antara lain kemampuan adhesi, perubahan morfologi dari bentuk *yeast* menjadi hifa, pembentukan biofilm, invasi jaringan, dan produksi enzim hidrolitik. Faktor-faktor tersebut berperan secara kompleks dan memungkinkan *C. albicans* bertahan serta beradaptasi dalam lingkungan inang (Henriques & Silva, 2021; Ciurea *et al*., 2020). Infeksi invasif oleh *Candida* tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang persisten (Pfaller & Diekema, 2007), dan karakterisasi faktor virulensi pada isolat klinis maupun dalam pembentukan

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

biofilm terus dilaporkan (Saiprom *et al*., 2023; Satala *et al*., 2022).

Salah satu kelompok enzim hidrolitik yang berperan dalam patogenesis *C. albicans* adalah *Secreted Aspartyl Proteinases* (Saps) yang dikodekan oleh famili multigen SAP dengan sepuluh anggota, yaitu *SAP1* hingga *SAP10* (Monod *et al*., 1994; Naglik *et al*., 2003). Enzim ini berfungsi memperoleh nutrisi, merusak membran dan protein sel inang sehingga memudahkan adhesi dan invasi jaringan, serta mendegradasi molekul sistem imun inang (Naglik *et al*., 2003). Peran dan pola ekspresi anggota famili ini tidak seragam; misalnya, penghapusan masing-masing *SAP1*, *SAP2*, atau *SAP3* menurunkan virulensi pada model hewan (Hube *et al*., 1997). *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6* dikelompokkan sebagai satu subfamili yang diekspresikan terutama selama pembentukan hifa (Correia *et al*., 2010; Felk *et al*., 2002). Felk *et al*. (2002) melaporkan bahwa ekspresi Sap4 hingga Sap6 diperlukan untuk invasi organ parenkim pada model infeksi intraperitoneal tikus, sedangkan Correia *et al*. (2010) menyimpulkan bahwa peran Sap1 hingga Sap6 terbatas pada model kandidiasis hematogen diseminata ketika digunakan mutan yang tidak dipengaruhi status URA3. Pada model epitel vagina manusia terekonstruksi, hanya *SAP5* yang terdeteksi teraktivasi di antara *SAP1* hingga *SAP6* (Lermann & Morschhäuser, 2008). Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa metode deteksi yang mampu membedakan anggota SAP secara individual diperlukan untuk menafsirkan peran masing-masing gen.

Kemiripan antaranggota subfamili *SAP4–SAP6* menimbulkan risiko amplifikasi silang pada deteksi *SAP4* berbasis PCR. Primer yang dirancang pada daerah dengan kemiripan sekuens tinggi dapat menempel pada lebih dari satu lokus. Apabila produk dari lokus *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6* berukuran sama, elektroforesis gel agarosa tidak dapat membedakan asal produknya, sehingga pita pada ukuran yang diharapkan belum tentu berasal dari *SAP4*. Risiko ini perlu diperiksa terhadap genom referensi dengan perangkat seperti Primer-BLAST sebelum primer digunakan untuk deteksi gen yang spesifik (Ye *et al*., 2012).

Deteksi gen SAP pada isolat klinis telah dilaporkan menggunakan PCR; misalnya, *SAP4* terdeteksi pada 94,7% isolat *C. albicans* dalam penelitian di India bagian barat (Pawar *et al*., 2022). Keberhasilan proses PCR dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk kualitas primer dan kondisi amplifikasi. Karakteristik primer seperti panjang primer, kandungan GC, *melting temperature* (Tm), serta potensi pembentukan struktur sekunder perlu dievaluasi sebelum primer digunakan dalam penelitian (Dieffenbach *et al*., 1993). Analisis *in silico* dan pengujian eksperimental merupakan tahapan yang saling melengkapi dalam menentukan kesesuaian suatu pasangan primer untuk amplifikasi PCR (Ye *et al*., 2012).

Pasangan primer yang dievaluasi dalam penelitian ini mengacu pada primer *SAP4* yang dilaporkan oleh Felk *et al*. (2002) dalam penelitian tentang peran Sap4 hingga Sap6 pada pembentukan hifa dan invasi organ parenkim. Pasangan ini dipertimbangkan karena menghasilkan *amplicon* 533 bp yang mudah dibedakan pada gel agarosa serta memiliki kandungan GC (47,37–50,00%) dan Tm (54,47–58,39°C) yang lebih tinggi daripada primer *SAP4* lain yang dilaporkan oleh Pawar *et al*. (2022) (*amplicon* 408 bp; GC 35,00–36,36%; Tm 47,34–49,66°C berdasarkan analisis awal penulis). Primer yang telah digunakan atau dilaporkan dalam penelitian sebelumnya belum tentu memberikan performa amplifikasi yang sama pada setiap kondisi laboratorium karena keberhasilan PCR juga dipengaruhi oleh komposisi reaksi, kualitas DNA *template*, instrumen, serta suhu *annealing* yang digunakan (Rychlik *et al*., 1990). Oleh karena itu, evaluasi karakteristik primer secara *in silico* yang diikuti dengan optimasi eksperimental tetap diperlukan sebelum pasangan primer diterapkan pada penelitian utama.

Kesenjangan penelitian yang dijawab adalah belum tersedianya evaluasi spesifisitas pasangan primer tersebut terhadap *SAP4* di antara paralognya (*SAP5* dan *SAP6*) pada genom referensi, serta belum diketahuinya kondisi *annealing* yang sesuai pada peralatan laboratorium penulis. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk (1) mengevaluasi karakteristik fisikokimia, struktur sekunder, dan spesifisitas primer *SAP4* secara *in silico*, dan (2) menentukan kandidat

suhu *annealing* melalui *gradient PCR* dengan kriteria evaluasi yang objektif. Kontribusi penelitian ini adalah menyajikan alur evaluasi *in silico*–eksperimental yang sederhana untuk menyaring pasangan primer gen paralog sebelum digunakan, serta menunjukkan apakah pasangan primer ini dapat dipakai untuk deteksi *SAP4* yang spesifik atau perlu dikonfirmasi dan didesain ulang.

Bahan dan Metode

Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang terdiri atas dua tahap, yaitu evaluasi kualitas primer secara *in silico* dan optimasi eksperimental kondisi PCR menggunakan metode *gradient* suhu *annealing*. Optimasi dilakukan sebagai uji pendahuluan dengan satu kali pengujian *gradient*, yaitu satu reaksi pada setiap suhu (n = 1), sehingga tidak dilakukan analisis statistik. Pengujian tidak diulang karena keterbatasan biaya reagen. Variabel bebas adalah suhu *annealing* (delapan taraf), variabel terikat adalah keberadaan, ukuran, dan intensitas pita produk PCR, sedangkan komposisi reaksi, DNA *template*, program siklus, dan kondisi elektroforesis dibuat sama pada seluruh perlakuan.

Target gen dan primer

Gen target yang digunakan dalam penelitian ini adalah gen *SAP4* (*Secreted Aspartyl Proteinase* 4) pada *Candida albicans*. Primer *SAP4* yang digunakan terdiri atas primer *forward* dan primer *reverse* dengan target produk amplifikasi sebesar 533 bp. Pasangan primer ini mengacu pada primer *SAP4* yang dilaporkan oleh Felk *et al*. (2002). Felk *et al*. (2002) mencantumkan ukuran produk pasangan primer ini sebesar 532 bp, sedangkan ukuran 533 bp pada penelitian ini mengacu pada prediksi Primer-BLAST terhadap genom referensi *C. albicans* SC5314.

Tabel 1. Sekuen primer untuk amplifikasi gen *SAP4*

Primer	Sekuen primer (5'-3')	Panjang (nt)	Ukuran *amplicon* (bp)
SAP4- F	CCGTTGGTATTGGTGGTGTT	20	533
SAP4-R	AGGAACGGAAATCTTGAGG	19	533

Evaluasi primer secara *in silico*

Evaluasi *in silico* dilakukan untuk menilai karakteristik fisikokimia, potensi pembentukan struktur sekunder, dan spesifisitas pasangan primer *SAP4* sebelum dilakukan optimasi PCR secara eksperimental. Parameter yang dianalisis meliputi panjang primer, persentase kandungan GC, *melting temperature* (Tm), pembentukan *hairpin*, *self-dimer*, *heterodimer*, serta nilai energi bebas Gibbs (ΔG).

Panjang primer, kandungan GC, dan karakteristik fisikokimia dasar dianalisis menggunakan OligoEvaluator. Nilai Tm dan spesifisitas primer terhadap sekuens target dievaluasi menggunakan Primer-BLAST (*National Center for Biotechnology Information*/NCBI), dengan pencarian dibatasi pada *database* RefSeq *genomes* dan organisme *Candida albicans*.

Potensi pembentukan struktur sekunder dianalisis menggunakan IDT OligoAnalyzer. Analisis meliputi *hairpin* dan *self-dimer* pada masing-masing primer *forward* dan *reverse* serta *heterodimer* antara kedua primer. Analisis dilakukan menggunakan konsentrasi oligonukleotida 0,2 µM, Na^+ 50 mM, dan Mg^{2+} 3 mM. Nilai ΔG digunakan untuk menggambarkan kestabilan struktur sekunder yang diprediksi.

Komposisi reaksi PCR

Reaksi PCR dilakukan menggunakan GoTaq® Green *Master Mix* (Promega) dengan volume total reaksi 25 µL. Komposisi campuran reaksi PCR disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi reaksi PCR

Komponen	Volume
GoTaq Green *Master Mix*	12,5 µL
SAP4-F	1 µL
SAP4-R	1 µL
DNA *template*	2 µL
Nuclease-free water	8,5 µL
Total	25 µL

Kondisi amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan Bio-Rad T100 *Thermal Cycler*. Program amplifikasi terdiri atas denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, diikuti 34 siklus yang masing-masing terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 60 detik. Amplifikasi diakhiri dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit, kemudian produk dipertahankan pada 4°C. Optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan *gradient PCR* pada delapan suhu, yaitu 60,0°C; 59,2°C; 58,0°C; 56,1°C; 53,8°C; 51,9°C; 50,7°C; dan 50,0°C. *Gradient* diatur dari 60°C (baris belakang blok) hingga 50°C (baris depan blok), dan setiap suhu diuji pada satu tabung reaksi (*lane* A–H). Seluruh komponen dan kondisi reaksi, selain suhu *annealing*, dipertahankan sama pada setiap perlakuan.

Elektroforesis produk PCR

Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% dalam *buffer* TAE dan divisualisasi menggunakan GelRed. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 60 V selama 120 menit. Promega BenchTop 100 bp DNA *Ladder* digunakan sebagai penanda ukuran fragmen DNA. Hasil elektroforesis dievaluasi berdasarkan keberadaan pita pada ukuran *amplicon* yang diharapkan, intensitas pita, dan keberadaan pita amplifikasi nonspesifik pada masing-masing suhu *annealing*.

Evaluasi hasil dan kriteria pemilihan suhu *annealing*

Kandidat suhu *annealing* ditentukan berdasarkan tiga kriteria yang diterapkan secara berurutan: (1) pita utama terdeteksi pada ukuran yang diharapkan, dengan perkiraan ukuran berdasarkan interpolasi logaritmik terhadap posisi pita *ladder*; (2) tidak terdapat pita tambahan atau gangguan lain di sekitar pita utama pada pemeriksaan visual; dan (3) di antara suhu yang memenuhi kriteria (1) dan (2), dipilih suhu dengan intensitas pita utama tertinggi; apabila selisih intensitas relatif kurang dari 10%, intensitas dianggap setara dan dipilih suhu yang paling dekat dengan rerata Tm kedua primer. Intensitas pita diukur secara semi-kuantitatif (densitometri) pada foto gel menggunakan skrip Python (NumPy), yaitu jumlah nilai piksel di atas latar lokal pada jendela *lane* selebar 60 piksel, dinyatakan relatif terhadap *lane* dengan intensitas tertinggi. Pengukuran ini hanya menggambarkan perbedaan relatif antar-*lane* pada satu foto gel dan tidak dimaksudkan sebagai kuantifikasi DNA. Kriteria ini dirumuskan untuk uji pendahuluan ini dan perlu divalidasi pada pengujian berulang.

Hasil dan Pembahasan

Hasil evaluasi primer *SAP4* secara *in silico*

Evaluasi *in silico* dilakukan terhadap pasangan primer *SAP4* yang digunakan dalam penelitian. Primer *forward* memiliki panjang 20 nukleotida dengan kandungan GC sebesar 50,00% dan *melting temperature* (Tm) sebesar 58,39°C, sedangkan primer *reverse* memiliki panjang 19 nukleotida dengan kandungan GC sebesar 47,37% dan Tm sebesar 54,47°C. Pasangan primer tersebut dirancang untuk menghasilkan *amplicon* dengan ukuran yang diharapkan sebesar 533 bp.

Hasil analisis struktur sekunder menunjukkan bahwa struktur *hairpin* yang diprediksi pada primer *forward* memiliki nilai ΔG +0,72 kcal/mol dengan Tm 11,7°C, sedangkan pada primer *reverse* memiliki nilai ΔG +0,70 kcal/mol dengan Tm 15,1°C. *Self-dimer* pada primer *forward* dan *reverse* masing-masing menunjukkan nilai ΔG −3,61 kcal/mol. Analisis *heterodimer* antara primer *forward* dan *reverse* menunjukkan struktur dengan nilai ΔG terendah sebesar −9,97 kcal/mol. Hasil evaluasi karakteristik primer secara keseluruhan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil evaluasi *in silico* pasangan primer *SAP4*

Parameter	Primer *forward*	Primer *reverse*
Panjang primer	20 nt	19 nt
Kandungan GC	50,00%	47,37%
Tm	58,39°C	54,47°C
Hairpin, ΔG	+0,72 kcal/mol	+0,70 kcal/mol
Hairpin, Tm	11,7°C	15,1°C
Self-dimer, ΔG	-3,61 kcal/mol	-3,61 kcal/mol
Heterodimer, ΔG	-	-9,97 kcal/mol*

**Catatan: Nilai ΔG menunjukkan struktur paling stabil yang diprediksi oleh IDT OligoAnalyzer. Nilai heterodimer merupakan interaksi antara primer forward dan reverse.*

Hasil spesifisitas primer menggunakan primer-BLAST

Analisis spesifisitas pasangan primer *SAP4* menggunakan Primer-BLAST, dengan pencarian dibatasi pada *database* RefSeq *genomes* dan organisme *Candida albicans*, menghasilkan tiga prediksi produk amplifikasi pada satu aksesi genom, yaitu NC_032094.1 (*Candida albicans* SC5314 *chromosome 6, complete sequence*). Ketiga produk amplifikasi tersebut diprediksi memiliki ukuran yang sama, yaitu 533 bp, tetapi berada pada tiga lokasi genomik yang berbeda, yaitu sekitar koordinat 745166–745698, 635693–636225, dan 558356–558888 pada kromosom 6.

Hasil Optimasi suhu *annealing* PCR

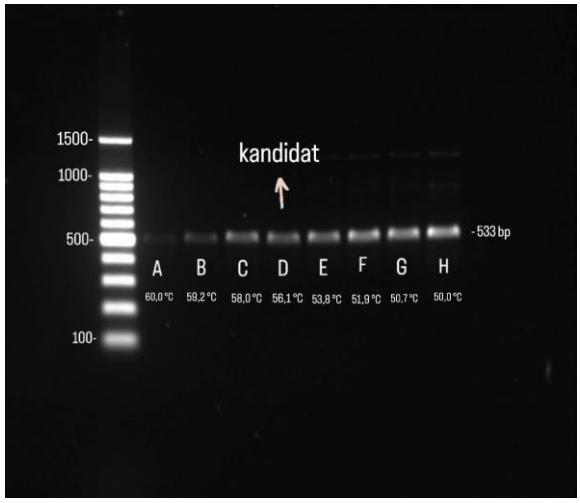
Hasil elektroforesis produk *gradient PCR* pada delapan variasi suhu *annealing* ditunjukkan pada Gambar 1. Pita utama terdeteksi pada seluruh suhu yang diuji, yaitu 60,0°C; 59,2°C; 58,0°C; 56,1°C; 53,8°C; 51,9°C; 50,7°C; dan 50,0°C. Berdasarkan interpolasi terhadap posisi pita *ladder* 100 bp, ukuran pita utama diperkirakan sekitar 520–550 bp, sesuai dengan perkiraan ukuran *amplicon* sebesar 533 bp.

Tabel 4. Hasil densitometri semi-kuantitatif pita produk *gradient PCR*

Lane (suhu)	Intensitas relatif pita utama (%)	Pita tambahan (visual)
A (60,0°C)	10	Tidak terlihat
B (59,2°C)	22	Tidak terlihat
C (58,0°C)	53	Tidak terlihat
D (56,1°C)	53	Tidak terlihat
E (53,8°C)	65	Terlihat (lemah)
F (51,9°C)	90	Terlihat (lemah)
G (50,7°C)	91	Terlihat (lemah)
H (50,0°C)	100	Terlihat (lemah)

Catatan: intensitas relatif dihitung terhadap *lane* H (100%). Data berasal dari satu foto gel (n = 1) dan bersifat semi-kuantitatif.

Intensitas relatif pita utama meningkat seiring penurunan suhu *annealing*, dari 10% pada 60,0°C hingga 100% pada 50,0°C (Tabel 4). Pita tambahan yang lemah terlihat secara visual pada *lane* E hingga H (53,8–50,0°C), sedangkan pita tambahan tidak terlihat pada *lane* A hingga D (60,0–56,1°C). *Lane* C (58,0°C) dan *lane* D (56,1°C) menunjukkan pita tunggal dengan intensitas yang setara (selisih kurang dari 5%). Berdasarkan kriteria pada subbab Evaluasi hasil dan kriteria pemilihan suhu *annealing*, *lane* A hingga D memenuhi kriteria pita utama tanpa pita tambahan; di antara keempatnya, *lane* C dan D memiliki intensitas tertinggi dan setara, sehingga dipilih suhu yang paling dekat dengan rerata Tm kedua primer (56,4°C), yaitu 56,1°C, sebagai kandidat suhu *annealing* untuk pengujian selanjutnya. Suhu 50,0°C yang menghasilkan pita paling terang tidak dipilih karena disertai pita tambahan.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk *gradient PCR SAP4* pada delapan suhu *annealing* (*lane* A–H; suhu dalam °C tertera di bawah huruf *lane*); marker = *DNA ladder* 100 bp (penanda ukuran dalam bp). Foto gel dipangkas dan diberi label tanpa penyesuaian kontras atau kecerahan. Pita tambahan yang lemah pada *lane* E–H; *lane* D (56,1°C) ditandai sebagai kandidat suhu *annealing* untuk penelitian selanjutnya.

Pembahasan

Evaluasi *in silico* dilakukan untuk menilai karakteristik pasangan primer *SAP4* sebelum digunakan dalam amplifikasi PCR. Primer *forward* memiliki panjang 20 nukleotida dengan kandungan GC sebesar 50,00%, sedangkan primer *reverse* memiliki panjang 19 nukleotida dengan kandungan GC sebesar 47,37%. Komposisi basa dan kandungan GC merupakan salah satu faktor penting dalam desain primer karena memengaruhi stabilitas ikatan primer dengan *template* dan nilai *melting temperature*

(Tm). Primer dengan kandungan GC yang terlalu tinggi dapat meningkatkan kestabilan struktur sekunder dan menyulitkan proses denaturasi, sedangkan kandungan GC yang terlalu rendah dapat menurunkan kestabilan hibridisasi primer dengan sekuens target (Green & Sambrook, 2019).

Nilai Tm primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebesar 58,39°C dan 54,47°C, sehingga terdapat perbedaan Tm sekitar 3,9°C antara kedua primer. Nilai Tm merupakan salah satu parameter penting dalam penentuan suhu *annealing*, karena stabilitas hibridisasi primer–*template* berkaitan erat dengan karakteristik termodinamika primer. Perhitungan Tm yang tepat diperlukan untuk membantu menentukan kondisi *annealing* yang mendukung amplifikasi secara efisien dan spesifik, terutama karena primer *forward* dan *reverse* harus mampu berhibridisasi secara efektif pada kondisi reaksi yang sama (Bustin & Huggett, 2017; Kayama *et al*., 2021; Zeng *et al*., 2022).

Karakteristik primer yang diperoleh secara *in silico* memberikan dasar awal untuk memperkirakan performa pasangan primer sebelum pengujian laboratorium. Evaluasi primer secara komputasional dapat membantu mengidentifikasi karakteristik yang berpotensi memengaruhi spesifisitas dan efisiensi PCR serta memperkirakan kemungkinan terjadinya amplifikasi nonspesifik sebelum dilakukan eksperimen *wet-lab* (Kalendar *et al*., 2017).

Analisis struktur sekunder menggunakan IDT OligoAnalyzer menunjukkan bahwa struktur *hairpin* yang diprediksi pada primer *forward* dan *reverse* masing-masing memiliki ΔG +0,72 dan +0,70 kcal/mol dengan Tm 11,7°C dan 15,1°C. Nilai Tm struktur *hairpin* tersebut berada jauh di bawah rentang suhu *annealing* yang diuji, sehingga struktur tersebut diperkirakan tidak stabil pada kondisi amplifikasi. Struktur sekunder seperti *hairpin* dapat mengurangi ketersediaan primer untuk berikatan dengan sekuens target apabila cukup stabil pada kondisi reaksi sehingga evaluasi kestabilan struktur sekunder merupakan bagian penting dalam desain primer PCR (Hendling & Barišić, 2019).

Self-dimer pada kedua primer memiliki ΔG −3,61 kcal/mol, sedangkan *heterodimer* antara primer *forward* dan *reverse* menunjukkan ΔG yang lebih rendah, yaitu −9,97 kcal/mol, sehingga interaksi *heterodimer* tersebut perlu mendapat perhatian. Secara termodinamika, nilai ΔG yang semakin negatif menunjukkan pembentukan struktur yang semakin menguntungkan dan cenderung lebih stabil. Pembentukan *dimer* primer yang stabil dapat mengurangi ketersediaan primer dan mengganggu amplifikasi target karena *dimer* dapat berkompetisi dengan *template* selama proses PCR (Kalendar, 2025).

Namun, struktur *heterodimer* yang diprediksi pada pasangan primer ini terutama melibatkan bagian 5′ dan bagian internal primer serta tidak melibatkan ujung 3′ kedua primer. Komplementaritas pada ujung 3′ merupakan faktor penting dalam pembentukan *primer-dimer* karena DNA polimerase melakukan ekstensi dari ujung 3′ primer. Oleh karena itu, interaksi primer–primer yang melibatkan ujung 3′ lebih berpotensi menghasilkan *dimer* yang dapat diperpanjang dan selanjutnya ikut teramplifikasi selama PCR (Kalendar, 2025). Dengan demikian, meskipun nilai ΔG *heterodimer* menunjukkan interaksi yang relatif stabil, tidak terlibatnya ujung 3′ mengindikasikan bahwa potensi terbentuknya *primer-dimer* yang dapat diperpanjang kemungkinan lebih rendah dibandingkan apabila komplementaritas terjadi pada ujung 3′. Meskipun demikian, prediksi *in silico* tetap perlu dikonfirmasi melalui pengujian PCR secara eksperimental karena performa primer juga dipengaruhi oleh kondisi reaksi, konsentrasi komponen PCR, dan interaksi primer dengan *template*.

Analisis Primer-BLAST menunjukkan bahwa pasangan primer yang digunakan menghasilkan tiga prediksi produk amplifikasi berukuran 533 bp pada tiga lokasi berbeda pada kromosom 6 *C. albicans* SC5314. Berdasarkan anotasi genom, ketiga lokasi tersebut berkorespondensi dengan lokus *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6*. Temuan ini menunjukkan bahwa pasangan primer tidak hanya memiliki kecocokan terhadap *SAP4*, tetapi juga terhadap dua lokus lain, yaitu *SAP5* dan *SAP6*. Kemampuan pasangan primer yang sama untuk menghasilkan prediksi *amplicon* pada ketiga lokus tersebut menunjukkan adanya kemiripan sekuens pada daerah yang dikenali oleh primer. Hasil Primer-BLAST tersebut menunjukkan bahwa daerah penempelan primer yang digunakan belum cukup unik untuk membedakan

SAP4 dari *SAP5* dan *SAP6*. Dengan demikian, terdapat potensi amplifikasi silang terhadap *SAP5* dan *SAP6*.

Pita utama sekitar 520–550 bp pada elektroforesis menunjukkan terbentuknya produk amplifikasi dengan ukuran yang sesuai dengan target yang diharapkan, tetapi belum cukup untuk membuktikan bahwa produk tersebut berasal secara eksklusif dari *SAP4*. Hal ini disebabkan *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6* diprediksi menghasilkan *amplicon* dengan ukuran yang sama. Perbedaan peran dan ekspresi ketiga gen tersebut (Felk *et al*., 2002; Lermann & Morschhäuser, 2008) membuat identitas produk menjadi penting apabila hasil PCR akan ditafsirkan sebagai deteksi *SAP4*. Oleh karena itu, apabila penelitian selanjutnya bertujuan mendeteksi *SAP4* secara spesifik, identitas produk perlu dikonfirmasi melalui sekuensing produk PCR atau menggunakan pasangan primer baru yang menargetkan daerah sekuens yang unik pada *SAP4*. Primer *SAP4* lain yang dilaporkan sebelumnya, misalnya oleh Pawar *et al*. (2022), sebaiknya dievaluasi dengan cara yang sama.

Optimasi PCR menggunakan gradien suhu *annealing* 50,0–60,0°C menunjukkan bahwa produk amplifikasi dapat terdeteksi pada seluruh suhu yang diuji. Intensitas pita utama meningkat pada suhu yang lebih rendah, tetapi pita tambahan yang lemah muncul pada 53,8°C dan suhu di bawahnya. Pola ini konsisten dengan penurunan stringensi penempelan primer pada suhu *annealing* yang lebih rendah, sehingga peluang *mispriming* dan terbentuknya produk nonspesifik meningkat, sedangkan suhu yang terlalu tinggi menurunkan hasil produk (Green & Sambrook, 2018; Rychlik *et al*., 1990). Pada kondisi pengujian ini, *lane* C (58,0°C) dan *lane* D (56,1°C) menunjukkan pita tunggal dengan intensitas yang setara, sehingga kedua suhu belum dapat dibedakan berdasarkan data yang ada. Suhu 56,1°C dipilih karena memenuhi kriteria yang ditetapkan, yaitu pita utama tanpa pita tambahan, intensitas pita tertinggi bersama 58,0°C, dan paling dekat dengan rerata Tm kedua primer (56,4°C). Pita yang paling terang (50,0°C) tidak dipilih karena disertai pita tambahan. Oleh karena itu, suhu tersebut dipilih sebagai kandidat suhu *annealing*, bukan sebagai suhu optimum definitif.

Interpretasi hasil optimasi ini masih memiliki beberapa keterbatasan. Pengujian dilakukan satu kali (n = 1) sehingga reprodusibilitas dan kestabilan pemilihan suhu belum dapat dinilai; diperlukan sedikitnya tiga ulangan independen serta pengujian lanjutan pada suhu 58,0°C dan 56,1°C. Pengukuran intensitas pita bersifat semi-kuantitatif karena berasal dari foto gel tanpa kalibrasi dan tidak dikoreksi terhadap kemungkinan saturasi, sehingga hanya menggambarkan perbedaan relatif antarlane. Selain itu, ukuran *amplicon* diperkirakan berdasarkan 100 bp DNA *ladder* sehingga posisi pita hanya memberikan estimasi ukuran fragmen dan belum memastikan identitas molekuler produk. Pengujian juga belum menyertakan kontrol positif maupun *no-template control* (NTC). Kontrol positif diperlukan untuk membantu memastikan bahwa sistem amplifikasi mampu mendeteksi target sebagaimana diharapkan, sedangkan NTC digunakan untuk mendeteksi kemungkinan kontaminasi atau amplifikasi yang terjadi tanpa keberadaan *template* target (Bustin *et al*., 2025).

Keterbatasan lain berkaitan dengan hasil Primer-BLAST yang memprediksi tiga produk amplifikasi berukuran sama pada lokus *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6*. Oleh karena itu, pita utama sekitar 520–550 bp pada elektroforesis belum dapat digunakan untuk membedakan asal produk dari ketiga lokus tersebut. Konfirmasi identitas produk melalui sekuensing produk PCR diperlukan apabila pasangan primer ini akan digunakan untuk mendeteksi *SAP4* secara spesifik. Dengan demikian, suhu *annealing* 56,1°C dapat dipertimbangkan sebagai kondisi kandidat untuk pengujian berikutnya, tetapi penerapannya untuk deteksi spesifik *SAP4* memerlukan validasi tambahan terhadap identitas dan spesifisitas produk amplifikasi.

Kesimpulan

Evaluasi *in silico* menunjukkan bahwa pasangan primer yang ditujukan untuk amplifikasi *SAP4* memiliki karakteristik fisikokimia yang secara umum mendukung amplifikasi PCR, dengan potensi pembentukan *hairpin* dan *self-dimer* yang relatif rendah, meskipun interaksi *heterodimer* masih perlu diperhatikan. Analisis Primer-BLAST menghasilkan tiga prediksi produk amplifikasi berukuran 533 bp pada kromosom 6 *Candida albicans* SC5314 yang berkorespondensi dengan

lokus *SAP4*, *SAP5*, dan *SAP6*, sehingga pasangan primer ini belum terbukti spesifik terhadap *SAP4*.

Pasangan primer ini dapat menghasilkan produk dengan ukuran yang diperkirakan (sekitar 520–550 bp), tetapi identitas produk PCR belum dikonfirmasi. Optimasi *gradient PCR* pada rentang suhu *annealing* 50,0–60,0°C menunjukkan bahwa suhu 56,1°C menghasilkan pita tunggal dengan intensitas setara dengan 58,0°C dan tanpa pita tambahan, sehingga hanya dapat direkomendasikan sebagai kandidat untuk pengujian lanjutan. Kondisi tersebut belum dapat dinyatakan optimum definitif karena pengujian dilakukan satu kali, evaluasi intensitas bersifat semi-kuantitatif, pengujian belum menyertakan kontrol positif dan NTC, dan identitas molekuler produk belum dikonfirmasi.

Implikasi untuk penelitian lanjutan: sebelum digunakan untuk deteksi *SAP4* pada isolat, produk PCR perlu disekuensing atau pasangan primer perlu didesain ulang pada daerah unik *SAP4*, dan suhu 56,1°C perlu diuji ulang dengan ulangan dan kontrol. Temuan ini memberikan kontribusi metodologis dalam evaluasi primer *SAP4* dengan menunjukkan bahwa karakteristik fisikokimia primer yang baik tidak selalu menjamin spesifisitas pada tingkat gen tunggal. Secara praktis, penerapan evaluasi *in silico* sebelum penggunaan primer dalam penelitian utama dapat membantu mengurangi pengulangan eksperimen, penggunaan reagen yang tidak perlu, serta biaya analisis lanjutan akibat amplifikasi target yang tidak spesifik.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional atas dukungan fasilitas laboratorium dan sarana penelitian yang diberikan selama pelaksanaan penelitian ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian dan penyusunan manuskrip.

Referensi

Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification, 14*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001

Bustin, S. A., Ruijter, J. M., van den Hoff, M. J. B., Kubista, M., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M. J., Huggett, J. F., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2025). MIQE 2.0: Revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. *Clinical Chemistry, 71*(6), 634–651. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043

Ciurea, C. N., Kosovski, I.-B., Mare, A. D., Toma, F., Pintea-Simon, I. A., & Man, A. (2020). *Candida* and candidiasis—Opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms, 8*(6), 857. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857

Correia, A., Lermann, U., Teixeira, L., Cerca, F., Botelho, S., Gil da Costa, R. M., Sampaio, P., Gärtner, F., Morschhäuser, J., Vilanova, M., & Pais, C. (2010). Limited role of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. *Infection and Immunity, 78*(11), 4839–4849. https://doi.org/10.1128/IAI.00248-10

Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications, 3*(3), S30–S37. https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H. C., Schäfer, W., & Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and Immunity, 70*(7), 3689–3700. https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3689-3700.2002

Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Touchdown polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols, 2018*. https://doi.org/10.1101/pdb.prot095133

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of GC-rich templates. *Cold Spring Harbor Protocols, 2019*(2). https://doi.org/10.1101/pdb.prot095141

Hendling, M., & Barišić, I. (2019). In-silico design of DNA oligonucleotides: Challenges and approaches. *Computational and Structural Biotechnology Journal, 17*, 1056–1065. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008

Henriques, M., & Silva, S. (2021). *Candida albicans* virulence factors and its pathogenicity. *Microorganisms, 9*(4), 704. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040704

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infection and Immunity, 65*(9), 3529–3538. https://doi.org/10.1128/iai.65.9.3529-3538.1997

Kalendar, R. (2025). Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis. *Molecular Therapy—Nucleic Acids, 36*(4), 102716. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102716

Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics, 109*(3–4), 312–319. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005

Kayama, K., Kanno, M., Chisaki, N., Tanaka, M., Yao, R., Hanazono, K., Camer, G. A., & Endoh, D. (2021). Prediction of PCR amplification from primer and template sequences using recurrent neural network. *Scientific Reports, 11*, Article 7493. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86357-1

Lermann, U., & Morschhäuser, J. (2008). Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology, 154*(11), 3281–3295. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022525-0

Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence, 13*(1), 89–121. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950

Monod, M., Togni, G., Hube, B., & Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Molecular Microbiology, 13*(2), 357–368. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00429.x

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67*(3), 400–428. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003

Pawar, M. Y., Hatolkar, S. M., & Misra, R. N. (2022). Phenotypic and molecular detection of virulence factor genes SAP4 and PLB in *Candida albicans* isolates from the Western part of India. *Medical Journal Armed Forces India, 78*, 271–276. https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2020.03.023

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews, 20*(1), 133–163. https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06

Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research, 18*(21), 6409–6412. https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409

Saiprom, N., Wongsuk, T., Oonanant, W., Sukphopetch, P., Chantratita, N., & Boonsilp, S. (2023). Characterization of virulence factors in *Candida* species causing candidemia in a tertiary care hospital in Bangkok, Thailand. *Journal of Fungi, 9*(3), 353. https://doi.org/10.3390/jof9030353

Satala, D., Gonzalez-Gonzalez, M., Smolarz, M., Surowiec, M., Kulig, K., Wronowska, E., Zawrotniak, M., Kozik, A., Rapala-Kozik, M., & Karkowska-Kuleta, J. (2022). The

role of *Candida albicans* virulence factors in the formation of multispecies biofilms with bacterial periodontal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11*, Article 765942. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.765942

Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—The virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi, 7*(2), 79. https://doi.org/10.3390/jof7020079

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics, 13*, Article 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Zeng, H., Chen, K., Ma, C., Zhu, B., Chuan, J., Zhang, S., Tang, L., Yang, T., Sun, Z., Yang, X., & Wang, Y. (2022). High-throughput primer design by scoring in piecewise logistic model for multiple polymerase chain reaction variants. *Scientific Reports, 12*, Article 21136. https://doi.org/10.1038/s41598-022-25561-z