

Desain Primer untuk Deteksi Gen *Diphtheria Toxin Repressor (dtxR)* sebagai Biomarker Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* Menggunakan *In Silico* PCR

Primer Design for Detection of The Diphtheria Toxin Repressor (dtxR) Gene as a Biomarker for Corynebacterium Diphtheriae Bacteria using In Silico PCR

HILARI RIO ROSA NASTITI
RACHMAD BAYU KUNCARA

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Semarang
Jl. Wolter Monginsidi No.115, Pedurungan, Semarang
Email: hilarirosa88@gmail.com

Abstrak

Corynebacterium diphtheriae merupakan bakteri penyebab penyakit difteri. Faktor virulensi *C. diphtheriae* berasal dari kemampuan bakteri tersebut memproduksi toksin bakteri. Produksi toksinnya diatur seperangkat gen yang disebut gen tox/dtx dan diregulasi oleh gen *dtxR*. Tujuan dari studi ini untuk mendesain primer yang digunakan untuk mengevaluasi gen *dtxR* menggunakan sekuens DNA bakteri. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan studi literatur menggunakan aplikasi *In silico Polymerase Chain Reaction (PCR)*, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Primer3Plus, dan Oligo Calculator. Sampel diperoleh dari genbank NCBI yaitu *C. diphtheriae dtxR* gene M80337.1. Pemeriksaan *In silico* PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang baru dirancang dari Primer3Plus dengan 50 DNA genom *Corynebacterium* spp. yang diambil dari database *In silico* PCR. Pasangan primer *dtxR*: '5-ACAGTTAGCCAAACCGTTGC-3' dan 5'-TGCGTTCAACTTCGTCCTC-3' dapat menghasilkan amplicon DNA tunggal berukuran 226 bp khusus untuk jenis *C. diphtheria* dan tidak ada pita amplicon yang dihasilkan dari genom *Corynebacterium* lain. Berdasarkan hasil studi sepasang primer spesifik tersebut dapat digunakan untuk uji *in vitro* PCR dan dimanfaatkan untuk pengembangan deteksi cepat penyakit difteri.

Kata Kunci : Difteri ; *Corynebacterium diphtheriae* ; DNA biomarker ; Desain Primer ; *dtxR*

Abstract

Corynebacterium diphtheriae is the bacteria that causes diphtheria. The virulence factor of *C. diphtheriae* comes from the bacteria's ability to produce bacterial toxins. Toxin production is regulated by a set of genes called tox/dtx genes and is regulated by the *dtxR* gene. The aim of this study was to design primers used to evaluate the *dtxR* gene using bacterial DNA sequences. This research is experimental research with a literature study approach using the *In silico Polymerase Chain Reaction (PCR)*, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Primer3Plus, and Oligo Calculator applications. The sample obtained from genbank NCBI was *C. diphtheriae dtxR* gene M80337.1. *In silico* PCR examination was carried out using newly designed primers from Primer3Plus with 50 genomic DNA of *Corynebacterium* spp. taken from the *In silico* PCR database. The *dtxR* primer pair: '5-ACAGTTAGCCAAACCGTTGC-3' and 5'-TGCGTTCAACTTCGTCCTC-3' can produce a single DNA amplicon measuring 226 bp specifically for *C. diphtheria* types and no amplicon bands were generated from other *Corynebacterium* genomes. Based on the study results, this pair of specific primers can be used for *in vitro* PCR testing and can be used to develop rapid detection of diphtheria.

Keywords: Diphtheria ; *Corynebacterium Diphtheriae* ; DNA biomarkers ; Primary design ; *dtxR*



1. Pendahuluan

Corynebacterium diphtheriae merupakan bakteri gram positif agen penyebab penyakit difteri. Faktor virulensi utama *C. diphtheriae* adalah toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin). Produksi toksin diatur seperangkat gen yang disebut gen tox/dtx dan diregulasi oleh gen dtxR (Sunarno et al., 2014). Gold standard untuk pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* adalah dengan metode konvensional (Elek test, Guinea pig dan vero cell cytotoxicity), namun Elek test mempunyai variasi hasil yang cukup beragam, membutuhkan waktu yang cukup lama, serta masalah ketersediaan reagen standard (Sunarno et al., 2013). Di sisi lain pemeriksaan dengan hewan coba banyak ditentang oleh para pecinta satwa dan vero cell membutuhkan biaya yang sangat tinggi (Efstratiou et al., 2010), sehingga dapat digunakan deteksi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan target gen tox region A dan B (Nakao & Popovic, 1997). Pemeriksaan toksigenisitas secara genotip dengan PCR memiliki keunggulan dari sisi kecepatan dan kemudahan dalam interpretasi hasil (Sunarno & Sariadji, 2016). Kendala muncul karena bakteri yang tidak mempunyai gen tox (strain nontoksigenik) tidak terdeteksi, padahal beberapa laporan menyebutkan bahwa strain nontoksigenik juga dapat menyebabkan penyakit mematikan dan dapat berubah menjadi toksigenik bila terinfeksi oleh Corynephage yang membawa gen tox.

Pencarian biomarker yang ideal pada penyakit dengan sensitivitas, spesifisitas, dan prediktabilitas tinggi harus difokuskan pada deteksi dan identifikasi agen infeksi (Mohan & Harikrishna, 2015). Gen dtx dibawa oleh bakteriofag yang berintegrasi dalam kromosom strain non-toksigenik dan non-virulen sehingga menjadi virulen dan sangat toksigenik (Rizki et al., 2013). Ekspresi gen dtx dalam memproduksi toksin diregulasi oleh gen dtxR yang dikatalisis oleh besi (Jessica et al., 1990). Gen dtx dan dtxR dapat digunakan sebagai marker (gen target) dalam metode deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheria*, namun pada penelitian (Sunarno et al., 2013) desain primer yang digunakan memiliki GC konten yang tinggi yang akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda pada primer dan template.

Desain primer merupakan langkah awal yang menentukan keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR (Suparman et al., 2016). Untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan desain secara *in silico* (Suryadi et al., 2014). Istilah *In silico* diciptakan pada akhir 1980-an, untuk merujuk pada eksperimen "virtual" yang ada "di dalam" komputer. Dalam studi genomik, *in silico* PCR bertujuan untuk menghitung hasil PCR secara teoritis dengan menggunakan genom bakteri sekuensing terkini, suatu teknik yang memungkinkan amplifikasi sekuens DNA spesifik (Alsamman et al., 2019). *In silico* atau virtual PCR dapat digunakan untuk memprediksi atau menghitung kemampuan secara teoritis pasangan primer untuk memperkuat fragmen gen yang ditargetkan dengan menggunakan urutan genom bakteri terkini yang disimpan dalam database. Teknik ini memungkinkan amplifikasi sekuens DNA spesifik yang mendukung keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan *in vivo* PCR (Ruslan et al., 2011). Selain untuk memprediksi kualitas primer dari segi keberhasilan produk, *In silico* juga dapat mengurangi trial dan error pada *in vivo* PCR laboratorium nantinya. Oleh sebab itu, dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mendesain primer baru untuk mengevaluasi dtxR sebagai biomarker deteksi *C. diphtheriae*.

2. Metode

Penelitian eksperimental dengan pendekatan studi literatur dilakukan melalui aplikasi dan website yang diakses menggunakan laptop. Aplikasi dan website yang digunakan seperti NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Primer3Plus, *In silico* PCR, dan Oligo Calculator. Sampel urutan gen toksin spesifik dtxR diperoleh dari genbank NCBI dengan nomor akses M80337.1. yang terlihat pada gambar 1 dan struktur 3D protein tergambar pada gambar 2. Selanjutnya, sekuens fasta gen digunakan sebagai bahan untuk desain primer menggunakan Primer3Plus (Ethica, Hidayati, et al., 2020). Dipilih pasangan primer yang tidak memiliki kemungkinan terjadi formasi hairpin, self-complementarity, dan dimerization

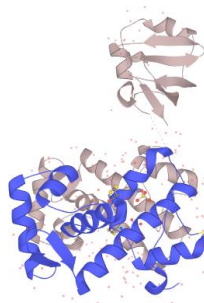
(Ethica, Darmawati, et al., 2020). Desain primer yang baru dirancang dari Primer3Plus digunakan sebagai masukan untuk in silico PCR berbasis web yang dijalankan dari <http://insilico.ehu.es/PCR/> menggunakan semua genom *Corynebacterium* yang diambil dari sumber database. Analisis akhir dilakukan dengan mengklik pita DNA yang muncul sebagai hasil produk PCR dalam output program. Langkah ini diperlukan untuk memperjelas jika produk In silico PCR (amplikon) bersifat spesifik ke genom *C.diphtheriae* dan benar-benar merupakan bagian dari gen spesifik yang ditargetkan sebagai biomarker (Ethica et al., 2019).

Gambar 1. Sekuen Fasta gen *dtxR* pada NCBI yang digunakan sebagai bahan desain primer

Corynebacterium diphtheriae diphtheria toxin repressor (dtxR) gene, complete cds

GenBank: M80337.1
[GenBank](#) [Graphics](#)
 >M80337.1 Corynebacterium diphtheriae diphtheria toxin repressor (dtxR) gene, complete cds
 AATCTTTAGATTAGGCGTTATAATTAAGTCTCATCGAAAAACGCGCTGCGGACTACAACGCAACAAGA
 AAACATTTCCATATTTTTCAGCTACAATTCGTTGTAGATTGATAGSAAATGATCACCACGACACAACAG
 TCTCCATGGCACATAAGGAAAGAGGCTTACAATGAAGGACTTAGTCGATACCACAGAGATGTAATTCG
 TACTATCTATGAGCTGGAAGAAAGAGGAGTCAACCCCTCTTCGCGCTAGSATCGCTGAGCGCTTGGAAACA
 TCTGGACCACAGTTAGC CAAACC GTT GCCCATATGGAGCGCGATGGACTTGTCTGTTCGCTCAGACC
 GCAGTCTACAAATGACACCGACAGGCCGCACTTTAGCGACTGCAATTTATGCGTAAACATCGCTTAGCTGA
 GCGCTCTTTACCGATATCATTGGTCTAGATATCAATAAAGTTCACGATGAAAGCTGCGCGCTGGGAACAC
 GTTATGAGTGACGAAGTTGAACGACGGCTGTGAAAGTATGAAAGATGTCAGTCGGTCCCTTCGGAA
 ACCCAATTCAGGCTCGACGAACTCGGCGTAGGCAATTCGACGCGGACGCCCCGGAACCTCGCGTTAT
 TGACGCTGCCACGAGTGCCTCGCAAAAGTACGCAATTTGTCAGATTAACGAAATCTTTCAAGTTGAAACG
 GATCAGTTTACACAGCTCTCGATGCTGACATCCGTGTTGGATCAGAAGTCGAAATTTGAGATAGAGACG
 GCCACATCACGTGAGCCACAATGGAAAAGATGTGAACTCCTCGATGATCTGGCTCACATATTCGTAT
 CGAAGAATCTAAATACTAAAGGCGGCGAAATAGATGAAACTCCTCGTTACCGGTGGCGCCGGATACGT
 AGGAAGTGTCTGTTCCACTGTTCTGCTGAAACAGGGGACGAAATTAACAATTTGCGATAATCTTACAAC
 GGCAATCGCGATGCTGTTCCGCTAGGAGCCACTTTTGTGAGGGTGTATCAAGACGTTGCGGAAAACGT
 TTACACTGTAGCTTCTAGCGGTTCTTCACTTCTTCTCTGCTGCTGTAGGCAATCAGTGAAGCCGATAG
 AATAGCGGAGAGAGGCGCACACGCACTC

Gambar 2. Struktur 3-D protein *dtxR* gen divisualisasi oleh Litemol (UniProt Accession Number: P0DJL7)



3. Hasil dan Pembahasan

Hasil

Tabel 1. Hasil primer yang dirancang dari Primer3Plus dari gen *dtxR*

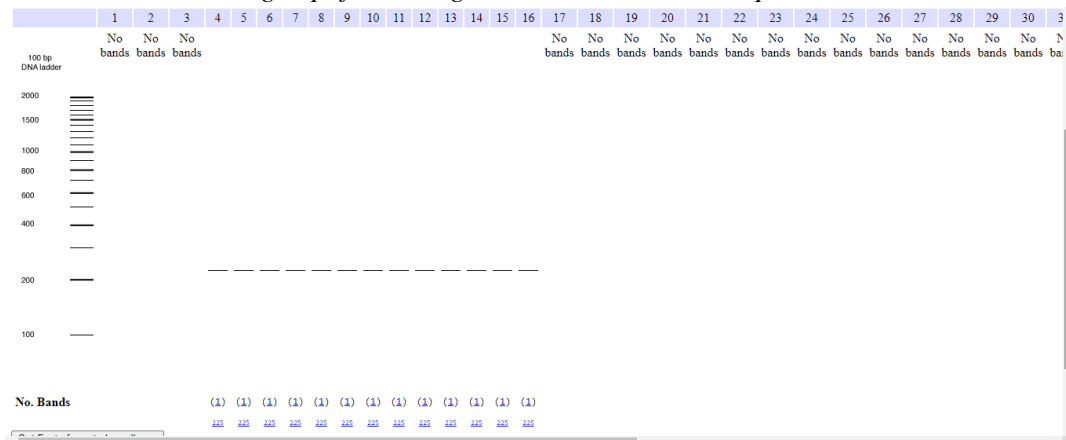
Primer Pair	Primer Forward	Primer Reverse	Ukuran Amplikon (bp)	Kode genom <i>C. diphtheriae</i> yang di amplifikasi
1	TGAGCGTCTGGAACAATCTG	GCGTTCAACTTCGTCACTCA	250	4,5,7-16
2	ACAGTTAGCCAAACCGTTGC	TGCGTTCAACTTCGTCACTC	226	4-16 (all strain <i>C. diphtheriae</i>)
3	ACAGTTAGCCAAACCGTTGC	GCGTTCAACTTCGTCACTCA	225	
4	ACGCAAGCTCGTGAAAGTAT	CAGCATCGAGGAGCTGTGTA	218	
5	TGAGCGTCTGGAACAATCTG	GGTAAGAAGGCGCTCAGCTA	169	4,5,7-16

Tabel 2. Daftar list *Corynebacterium* spp. pada database in silico PCR. List kuning menunjukkan strain *C. diphtheriae* (12 genom) yang teramplifikasi menggunakan desain primer baru pada saat studi berlangsung.

Daftar list *Corynebacterium strain* pada database in silico PCR

1 - <i>Corynebacterium argenteratense</i> DSM 44202	26 - <i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> DSM 44385
2 - <i>Corynebacterium aurimucosum</i> ATCC 700975	27 - <i>Corynebacterium maris</i> DSM 45190
3 - <i>Corynebacterium callunae</i> DSM 20147	28 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 1/06-A
4 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	29 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 1002
5 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> 241	30 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 258
6 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> 31A	31 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 267
7 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> BH8	32 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 3/99-5
8 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 (beta)	33 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 31
9 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CDCE 8392	34 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 316
10 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC01	35 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 42/02-A
11 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC02	36 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> C231
12 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC03	37 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CIP 52.97
13 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC04	38 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> Cp162
14 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> INCA 402	39 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> FRC41
15 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW8	40 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> I19
16 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> VA01	41 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> P54B96
17 - <i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	42 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PAT10
18 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 Bielefeld	43 - <i>Corynebacterium resistens</i> DSM 45100
19 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 Kitasato	44 - <i>Corynebacterium terpenotabidum</i> Y-11
20 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001	45 - <i>Corynebacterium ulcerans</i> 0102
21 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> R	46 - <i>Corynebacterium ulcerans</i> 809
22 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> SCgG1	47 - <i>Corynebacterium ulcerans</i> BR-AD22
23 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> SCgG2	48 - <i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109
24 - <i>Corynebacterium halotolerans</i> YIM 70093 = DSM 44683	49 - <i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7111
25 - <i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	50 - <i>Corynebacterium variabile</i> DSM 44702

Gambar 3. Produk pita amplikon (226 bp) yang dihasilkan oleh pasangan primer ke-2 yang mengamplifikasi 12 genom strain khusus *C. diphtheriae*



Gambar 4. Prediksi urutan DNA salah satu band yang teramplifikasi menggunakan pasangan primer ke-2 dtxR untuk *C. diphtheriae*

Sequence retrieval

Genome: *Corynebacterium diphtheriae*

Start position: 1431451

End position: 1431676

Length: 226

DNA sequence

```
>NC_002935, from 1431451 to 1431676 (226 bp); Corynebacterium diphtheriae  
ACAGTTAGCCAAACCGTTGCCCGATGGAGCGCGATGGACTTGTGCTTGCCTCAGACCGCAGCTCTAC  
AAATGACACCGGACAGGCGGCACTTTAGCGACTGCAGTTATGCGTAAACATCGCTTAGCTGAGCGCCTCT  
TACCGATATCATTGGCCATAGATATCAATAAAGTTACGATGAAGCTGCCGCTGGGAACACGTTATGAGT  
GACGAAGTTGAACGCA
```

[Translate to protein](#)

[Restriction digest](#)

[BLAST](#)

[Design primers with primer3](#)

[Genome related info at NCBI](#)

Gene(s) or part of gene(s) amplified:

ORF. 1431335-1432015 [Sequence](#) [DIP1414 dtxR diphtheria toxin repressor](#)

Gambar 5. Hasil output lengkap pasangan primer ke-2 dari Primer3Plus

Pair 2:						
<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	M80337.1 Corynebacterium diphtheriae diphtheria tc					
Sequence:	ACAGTTAGCCAAACCGTTGC					
Start: 290	Length: 20 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 50.0 %	ANY: 7.0	SELF: 2.0	
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	M80337.1 Corynebacterium diphtheriae diphtheria tc					
Sequence:	TGCGTTCAACTTCGTCACCTC					
Start: 515	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 5.0	SELF: 0.0	
Product Size: 226 bp		Pair Any: 4.0		Pair End: 0.0		
Send to Primer3Manager Reset Form						
Pair 3:						
<input type="checkbox"/> Left Primer 3:	M80337.1 Corynebacterium diphtheriae diphtheria tc					
Sequence:	ACAGTTAGCCAAACCGTTGC					
Start: 290	Length: 20 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 50.0 %	ANY: 7.0	SELF: 2.0	
<input type="checkbox"/> Right Primer 3:	M80337.1 Corynebacterium diphtheriae diphtheria tc					
Sequence:	GCGTTCAACTTCGTCACCTCA					
Start: 514	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 5.0	SELF: 1.0	
Product Size: 225 bp		Pair Any: 4.0		Pair End: 1.0		

Pembahasan

Gen dtxR dimiliki oleh semua strain *C. diphtheriae*, baik toksigenik maupun non toksigenik sehingga gen ini dapat digunakan sebagai penanda *C. diphtheria* (Sunarno et al., 2017). Sekuen fasta gen yang terdaftar dalam NCBI pada gambar 1 dilakukan analisa desain primer menggunakan Primer3Plus lalu dilanjutkan dengan studi In silico. Hasil studi desain primer dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Hasil studi In silico PCR didapatkan 3 pasang primer yang dapat mengamplifikasi seluruh strain *C. diphtheriae* yaitu pasangan primer ke-2, 3 dan 4 yang menghasilkan produk amplikon sebesar 226 bp (Gambar 3), 225 bp, dan 218 bp. Ketiga pasang primer kemudian diuji kualitas primer untuk menentukan primer terbaik yang dapat mengamplifikasi strain *C. diphtheriae*. Uji kualitas primer menggunakan website Oligo calculator <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Hasil menunjukkan bahwa primer reverse pada pasangan primer ke-3 dan 4 berpotensi terjadi hairpin sehingga dapat membentuk struktur sekunder dalam primer, sedangkan pasangan primer ke-2 memiliki kualitas yang baik.

*) Penulis Corespondensi: Hilari Rio Rosa Nastiti ; Email: hilarirosa88@gmail.com

Setelah melakukan In silico PCR, perlu untuk memeriksa apakah produk amplikon yang terlihat pada elektroforesis gel virtual (Gambar 3) benar berdasarkan posisi primer. Analisis dilakukan dengan mengklik ukuran band amplikon yang muncul di In silico PCR. Hasil menunjukkan bahwa amplikon memang bagian dari gen dtxR (Gambar 4). Urutan DNA yang terlihat pada gambar 4 mewakili satu dari dua belas PCR amplikon yang dijalankan In silico PCR menggunakan pasangan primer ke-2 yang dipilih (lihat Tabel 1) dan genom vibrios (spesies nomor 4, lihat Tabel 2).

Primer merupakan salah satu komponen yang memiliki peran penting dalam proses PCR (Septiari et al., 2015). Primer disebut baik bila primer tersebut spesifik. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi (Suryadi et al., 2014). Pasangan primer ke-2 merupakan pasangan primer yang paling baik karena memiliki spesivitas yang tinggi dan dapat mengamplifikasi seluruh genom *C. diphtheria* pada In silico PCR. Selain itu, hasil uji kualitas primer menggunakan Oligo Calculator juga menunjukkan ciri primer yang baik (Gambar 5) seperti memiliki panjang primer 20 bp, memiliki GC konten 50%, temperature melting 60-60,2^oC serta tidak ditemukan formasi hairpin, self-complementarity, dan dimerization. Terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer diantaranya adalah panjang primer, temperature melting (T_m), kandungan GC dan ikatan di ujung 3'. Primer yang baik berkisar antara 18-30 pasang basa. Primer yang memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa akan menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik. Karakteristik kedua yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer adalah T_m. Primer yang baik memiliki selisih T_m sekitar 50^oC agar tidak terjadi penurunan pada proses amplifikasi. Prosentase antara basa G dan C juga perlu diperhatikan karena kandungan jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi T_m yang dimiliki suatu primer (Dewi et al., 2018). Primer yang baik mempunyai prosentase G dan C sekitar 40-60%. Kriteria lainnya untuk primer yang baik yaitu memiliki self 3' complementarity yang rendah agar tidak terjadi penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur yang disebut hairpin. Pasangan primer ke-2 memiliki self 3' complementarity paling rendah sehingga menjadi kandidat primer terbaik untuk mengamplifikasi seluruh genom *C. diphtheria*.

Penelitian tentang desain primer untuk mendeteksi gen dtxR menggunakan PCR pernah dilakukan dengan pasangan primer tersebut adalah '5-TGCCCGTATGG AGCGCGATG-3' dan '5-GTTCCCAGCGGCAGGCTTCA-3' (Sunarno et al., 2013). Meskipun pasangan primer tersebut memiliki spesivitas tinggi, namun GC konten terlalu besar hingga 65%, kandungan GC tinggi akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda pada primer dan template. Berdasarkan hal ini, pasangan primer yang baru dirancang yaitu dtxR: '5-ACAGTTAGCCAAACCGTTGC-3' dan 5'-TGCGTTCAACTTCGTCCTC-3' (Gambar 6) yang diperoleh dalam studi ini dapat diterima secara teoritis dan berpotensi dilanjutkan ke dalam uji in vitro PCR untuk mendeteksi gen dtxR pada *C. diphtheriae*.

4. Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan hasil studi pada In silico PCR di dapatkan pasangan primer spesifik yang dapat digunakan untuk deteksi gen dtxR yaitu dtxR: '5-ACAGTTAGCCAAACCGTTGC-3' dan 5'-TGCGTTCAACTTCGTCCTC-3'. Pasangan primer tersebut memiliki kualitas primer terbaik dan terhindar dari faktor terjadinya formasi hairpin, self-complementarity, dimerization serta dapat mengamplifikasi seluruh genom *C. diphtheriae* yang ada pada In silico PCR.

Saran

Pasangan primer spesifik perlu diuji secara in vitro PCR untuk mendeteksi gen dtxR pada *C. diphtheria* menggunakan sampel klinik.

5. Daftar Pustaka

- Alsamman, A. M., Ibrahim, S. D., & Hamwieh, A. (2019). KASPSpoon: an in vitro and in silico PCR analysis tool for high-throughput SNP genotyping. *Bioinformatics*, 35(17), 3187–3190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz004>
- Dewi, R., Dewi, V., Yowani, S., & Yustiantara, P. (2018). Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen inh A Isolat P016 Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *J Farm Udayana*, 7(1), 34–39.
- Efstratiou, A., Engler, K. H., Mazurova, I. K., Glushkevich, T., Vuopio-Varkila, J., & Popovic, T. (2010). Current Approaches to the Laboratory Diagnosis of Diphtheria. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(11), 46–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/315552>
- Ethica, S. N., Darmawati, S., Dewi, S. S., Nurrahman, & Sulistyanyngtyas, A. R. (2020). Streptolysin encoding genes sagc and sagd as biomarkers of fish pathogen streptococcus iniae: An in silico study. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15(1), 31–39. <https://doi.org/10.15578/squalen.v15i1.416>
- Ethica, S. N., Hidayati, N., Fuad, H., Arham, C., Ariyadi, R., & Purwaningrum, E. (2020). Detection of rtxA Gene as a Biomarker of Seafood-Borne Pathogen Vibrio cholerae using In Silico PCR Assay. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15(2), 91–98. <https://doi.org/10.15578/squalen.v15i2.417>
- Ethica, S. N., Sulistyanyngtyas, A. R., & Darmawati, S. (2019). In-silico specificity comparison between GMF-GMR and JMF-JMR primers for detecting moaC genes of food spoilage bacteria pseudomonas spp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 292(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012033>
- Jessica, B., Oza, M. N., & Murphy, J. R. (1990). Molecular cloning Tox, and DNA sequence analysis of a diphtheria From, iron-dependent regulatory element (dtxR) Acad., Corynebacterium diphtheriae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5968–5972).
- Mohan, A., & Harikrishna, J. (2015). Biomarkers for the diagnosis of bacterial infections: in pursuit of the “Holy Grail.” *Indian J Med Res*, 141(3), 271. <https://doi.org/doi:10.4103/0971-5916.156551>.
- Nakao, Hi., & Popovic, T. (1997). Development of a Direct PCR Assay for Detection of the Diphtheria Toxin Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1651–1655.
- Rizki, A., Sariadji, K., Malik, A., & Karuniawati, A. (2013). Direct Polymerase Chain Reaction : Sebuah Alternatif Metode Diagnostik Difteri Secara Cepat , Mudah dan Hemat. *Makara Seri Kesehatan*, 7, 88–94.
- Ruslan, K., Lee, D., & Schulman, A. H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(137–144).
- Septiari, I., Yowani, P., & Yustiantara, S. (2015). Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter inhA Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Kim*, 9(1), 117–123.
- Sunarno, Kambang Sariadji, & Holly Arif Wibowo. (2013). Potensi Gen dtx dan dtxR Sebagai Marker Untuk Deteksi Dan Pemeriksaan Toksigenisitas Corynebacterium diphtheriae. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 41(1), 1–10.
- Sunarno, Mulyastuti, Y., Puspadari, N., & Sariadji, K. (2017). DNA Sequence Analysis of dtxR Gene (Partial) of Corynebacterium diphtheriae Causing Diphtheria in Jawa and Kalimantan Islands, Indonesia. *Indones Biomed J.*, 9(2), 91–98. <https://doi.org/10.18585/inabj.v9i2.268>
- Sunarno, S., Muna, F., Fitri, N., Malik, A., Karuniawati, A., & Soebandrio, A. (2014). Metode Cepat Ekstraksi Dna Corynebacterium diphtheriae Quick Method To Extract Corynebacterium Diphtherinae. *Indonesian Bulletin of Health Research*, 42(2), 85–92.
- Sunarno, & Sariadji, K. (2016). Perbandingan Pemeriksaan Toksigenisitas secara Genotip dan Fenotip pada Beberapa Isolat Corynebacterium diphtheriae Penyebab Difteri di Indonesia. *Biotek Medisiana Indonesia*, 5(2), 143–151.

- Suparman, Ahmad, H., & Ahmad, Z. (2016). Desain Primer PCR Secara in silico untuk Amplifikasi Gen COI pada Kupu-kupu *Papilio ulysses* Linnaeus dari Pulau Bacan. *J Pendidik Mat dan IPA*, 7(1), 14–25.
- Suryadi, P., Ratnayani, K., & Yowani, S. (2014). Desain Primer untuk Amplifikasi Gen katG Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Kim*, 8(1), 77–82.