

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang biologi molekuler pada masa modern semakin berkembang dan membawa pengaruh besar di Indonesia, salah satunya di bidang kesehatan. Pemeriksaan dengan metode biologi molekuler memiliki beberapa keunggulan, yaitu sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi serta pengurangan waktu dalam proses analisis. Perkembangan teknologi di bidang ini juga menjadi sesuatu yang baru dalam deteksi dini sumber infeksi yang dapat membantu dalam tahap proses diagnosis, serta dapat mendeteksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus (Praningsih, 2025).

Bakteri *Corynebacterium diphtheria* atau *C. diphtheria* merupakan bakteri gram positif penyebab penyakit difteri yang merupakan salah satu penyakit mematikan terutama pada anak dan dewasa era pre-vaksin. Apabila tidak diobati dan kasus tidak mempunyai kekebalan, angka kematian sekitar 50%, sedangkan dengan terapi angka kematiannya 10%. Angka kematian difteri rata-rata 5 – 10% pada anak usia kurang 5 tahun dan 20% pada dewasa di atas 40 tahun. Difteri merupakan jenis penyakit menular yang dapat menimbulkan KLB (Kejadian Luar Biasa/Wabah. Menurut Profil Kesehatan Indonesia kasus Difteri menyebar diseluruh provinsi di Indonesia, pada tahun 2023 terdapat 949 kasus dengan kasus kematian 68 kasus dan pada tahun 2024

yaitu 943 kasus dengan kasus kematian 42 kasus, namun angka ini masi harus menjadi perhatian kesehatan di Indonesia. Kegiatan penanggulangan KLB difteri dilakukan dengan melibatkan program-program terkait yaitu survailens epidemiologi, program imunisasi, klinisi, laboratorium dan program kesehatan lainya serta lintas terkait (Kemenkes, 2024).

Faktor virulensi utama *Corynebacterium diphtheria* yaitu toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin). Produksi toksin diatur seperangkat gen yang disebut gen tox/dtx (*diphtheria toxin gene*) dan diregulasi oleh gen dtxR (*Diphtheria Toxin Repressor*) yang dikatalis oleh besi (Fe). Gen dtx dibawa oleh bakteriofag yang berintegrasi dalam kromosom strain non-virulen sehingga menjadi virulen dan sangat toksigenik. Gen dtx dan dtxR dapat digunakan sebagai marker (gen target) dalam metode deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheria* (Nastiti dan Kuncara, 2023).

*Gold standard* untuk pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* adalah dengan metode konvensional (Elek test dan uji toksisitas *in vivo/animal toxicity test*), namun dalam pelaksanaannya, teknik tersebut tidak selalu bisa dilaksanakan. Elek test mempunyai variasi hasil yang cukup beragam sehingga memerlukan laboratorium terstandar dan teknisi yang berpengalaman serta membutuhkan waktu yang cukup lama. Selain itu ketersediaan reagen standar untuk pemeriksaan merupakan masalah tersendiri di beberapa negara, termasuk Indonesia. Di sisi lain pemeriksaan dengan hewan coba banyak ditentang oleh para pecinta satwa. Sehingga alternatif pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* dapat dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR)

dengan menggunakan target gen tox. Namun terdapat kendala karena bakteri yang tidak mempunyai gen tox (strain nontoksigenik) tidak terdeteksi, menurut penelitian Sunarno dkk., 2020 menyebutkan bahwa strain nontoksigenik juga dapat menyebabkan penyakit mematikan dan dapat berubah menjadi toksigenik bila terinsersi oleh *Corynephage* yang membawa gen tox (toksigenitas). Oleh karena itu gen dtxR dapat digunakan sebagai marker deteksi *C. diphtheriae* karena gen ini terdapat pada *C.diphtheriae* yang bersifat toksigenik maupun nontoksigenik (Sunarno dkk., 2020).

Perancangan primer merupakan langkah awal untuk memperoleh primer yang dapat digunakan dalam amplifikasi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) dengan metode PCR. Kegagalan dalam amplifikasi dapat disebabkan karena ketidakcocokan penempelan primer pada tahap *annealing*. Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target sehingga menghasilkan produk PCR yang spesifik. Perancangan primer yang akan digunakan untuk amplifikasi harus memenuhi kriteria-kriteria yang sesuai yaitu meliputi panjang primer, komposisi primer, *melting temperatur* (Tm) dan interaksi primer-primer (Pradnyaniti dan Yowani, 2019).

Suatu primer yang baik untuk amplifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan desain secara *in silico* yaitu merancang primer dengan bantuan suatu program yang ada didalam komputer dan dengan studi literatur. *In silico* PCR bertujuan untuk menghitung hasil PCR secara teoritis dengan memanfaatkan genom bakteri sekuensing terkini, teknik ini dapat memungkinkan amplifikasi sekuens DNA secara spesifik. *In silico* atau virtual

PCR dapat digunakan untuk memprediksi atau menghitung kemampuan secara teoritis dari pasangan primer untuk memperkuat fragmen gen yang ditargetkan dengan menggunakan urutan genom bakteri terkini yang disimpan dalam database. Teknik ini dapat memungkinkan amplifikasi sekuens DNA spesifik yang mendukung keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan *in vivo* PCR. Selain untuk memprediksi kualitas primer dari segi keberhasilan produk, *In silico* juga dapat mengurangi *trial and error* pada *in vivo* PCR laboratorium nantinya (Nastiti dan Kuncara, 2023). Oleh sebab itu, dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mendesain primer baru untuk mengevaluasi dtxR sebagai biomarker deteksi *C. diphtheriae*.

## **B. Rumusan Masalah**

Bagaimana rancangan pasangan primer yang spesifik untuk amplifikasi Gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae*?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Mengidentifikasi daerah konservatif dari urutan gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dengan menggunakan *Wabsite* MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) dan Aplikasi Unipro UGENE.
2. Merancang kandidat pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae*.
3. Menganalisis struktur sekunder pasangan primer spesifik menggunakan *Wabsite* NetPrimer untuk amplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor*

(dtxR) Pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae*.

4. Menguji similaritas dengan mengunggah urutan primer nukleotida pada *Wabsite* Nucleotide BLAST dari pasangan primer yang telah dirancang untuk menguji kemampuan mengamplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* menggunakan metode *in silico*.

#### **D. Ruang Lingkup**

Penelitian ini dilakukan dalam ruang lingkup ilmu Teknologi Laboratorium Medis bidang Biologi Molekuler

#### **E. Manfaat Penelitian**

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi ilmiah di bidang Biologi Molekuler mengenai Gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) Pada Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan perancangan primer berbasis komputasi secara *in silico* untuk analisis PCR.

2. Manfaat praktis

Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan rekomendasi dalam pengembangan untuk pengujian molekuler diagnosis penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Corynebacterium diphtheriae*. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan kandidat primer yang potensial dan optimal untuk digunakan dalam metode deteksi molekuler (PCR) *Corynebacterium diphtheriae* di laboratorium diagnostik Indonesia dan dapat berkontribusi dalam pengembangan penelitian biomedis berbasis komputasional.

## F. Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian penelitian

Penulis (tahun)/judul	Hasil penelitian	Kesamaan	Perbedaan
Praningsih (2025)/Perancangan Primer Gen <i>HBx</i> Pada <i>Hepatitis B</i> <i>Virus</i> (HBV) Menggunakan Pendekatan <i>In</i> <i>Silico</i> Untuk Analisis PCR	Penelitian ini berhasil mendapatkan pasang primer yang memiliki spesifitas tinggi untuk amplifikasi gen <i>HBx</i> pada HBV. Perancangan primer menggunakan Primer-BLAST, sekuen gen di ambil dari NCBI, kandidat primer dianalisis dengan NetPrimer dan diuji similaritas menggunakan Nucleotide BLAST.	Metode perancangan, <i>software</i> untuk merancang dan menganalisis kandidat primer	Gen spesifik dan organisme patogen
Merdekawati dan Nurhayati (2023)/ Desain Primer Gen Pengkode Dependent RNA Polimerase (RdRp) Untuk Deteksi Sars Cov2 Dengan Menggunakan qPCR	Desain primer dilakukan secara <i>in</i> <i>silico</i> menggunakan aplikasi primer3 plus. Didapatkan urutan primer terpilih yang dapat digunakan untuk mendeteksi gen RdRp pada SARS- CoV-2 dengan kondisi PCR optimal yang ditetapkan	Metode perancangan	Gen spesifik, organisme patogen, <i>software</i> untuk merancang dan menganalisis primer
Nastiti dan Kuncara (2023)/Desain Primer untuk Deteksi Gen	Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan pendekatan	Metode perancangan, gen spesifik dan	<i>software</i> untuk merancang dan menganalisis

---

<i>Diphtheria Toxin Repressor (dtxR)</i> sebagai Biomarker Bakteri <i>Corynebacterium diphtheriae</i> Menggunakan <i>In Silico</i> PCR	studi literatur menggunakan aplikasi bioinformatika seperti NCBI Genbank, Primer3Plus, <i>In silico</i> PCR, dan Oligo Calculator. Didapatkan primer spesifik untuk uji in vitro PCR penyakit difteri	organisme	primer, uji similaritas
---	--	-----------	-------------------------

---