

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. *Corynebacterium diphtheriae* dan Patogenesis Difteri

Corynebacterium diphtheriae atau *C. diphtheriae* merupakan bakteri batang gram-positif, mati pada pemanasan 60°C, tahan terhadap keadaan beku dan kering serta tumbuh secara anaerob fakultatif yaitu dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen (Moller dkk., 2021). Bakteri ini penyebab penyakit difteri, penyakit yang menyerang saluran nafas atas, pada beberapa kasus mengenai kulit dan beberapa organ lainnya (Sunarno dkk., 2020). Bakteri ini menghasilkan eksotoksin penyebab nekrosis jaringan dalam hal ini pada tenggorokan, dapat menimbulkan penyempitan saluran pernapasan sehingga seseorang mengalami kesulitan bernapas dan bahkan kematian (Munthe dan Dewi, 2019). Difteri pada saluran pernafasan biasanya disebabkan oleh bakteri *C. diphtheriae* toksinogenik, sedangkan difteri pada kulit sering disebabkan oleh bakteri *C. Diphtheriae* non-toksinogenik (Adriati, 2021).

Cara penularan penyakit Difteri yaitu melalui droplet atau kontak langsung dari inang yang terinfeksi atau pembawanya. Penyakit ini juga dapat ditularkan melalui kontak langsung dengan benda atau sekresi yang sebelumnya bersentuhan dengan orang yang terinfeksi (Atira, 2020). Beberapa laporan menduga bahwa infeksi difteri pada kulit merupakan

predisposisi kolonisasi pada saluran nafas. Masa inkubasi bakteri *C. diphtheriae* ini antara 2 - 5 hari (Sampealang dkk., 2021). Gejala klinis difteri dapat berupa panas, sakit tenggorok, kelelahan, stridor, muntah, dan terbentuknya *pseudo* membran yang disertai inflamasi disekitar focal infeksi dan terkadang terdapat pembengkakan leher. Bila terus berkelanjutan dapat terjadi komplikasi berupa penghambatan jalan nafas, gangguan saraf, jantung dan ginjal. Komplikasi ini dapat berhubungan dengan efek dari toksin yang dihasilkan oleh bakteri *C. Diphtheriae* (Febriyana dkk., 2021).

Kelompok risiko tinggi adalah anak-anak dan orang lanjut usia, namun pada era vaksinasi sekarang ini terjadi perubahan epidemiologi, dimana difteri juga terjadi pada orang dewasa. Epidemik atau peningkatan kasus di suatu daerah yang sudah lama bebas dari penyakit difteri dapat timbul karena adanya penderita atau karier yang datang dari daerah endemik, penurunan cakupan imunisasi dan perubahan virulensi bakteri (Sunarno dan Sariadji., 2020).

Imunisasi merupakan salah satu upaya pencegahan penularan penyakit difteri yang paling efektif, imunisasi dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi difteri, termasuk mempengaruhi tingkat keparahan dan risiko fatalitas yang dapat ditimbulkannya. Case Fatality Rate (Tingkat Fatalitas Kasus) pada penderita yang tidak diobati dan tidak pernah dimunisasi sebesar 29%. Berdasarkan *systematic review* dan *pooled analysis* (Truelove dkk., 2020) pada KLB difteri di Ukraina, Laos, Rusia,

Vietnam, U.S dan India diketahui bahwa imunisasi difteri minimal tiga dosis menggunakan vaksin DPT (Difteri, Pertusis dan Tetanus) memberikan perlindungan sebesar 87% untuk melawan penyakit bergejala dan efektivitas vaksin akan meningkat berdasarkan dosis hingga mencapai 99% setelah menerima minimal lima dosis vaksin yang mengandung komponen difteri (Fardania dan Wahyono, 2023).

a. Klasifikasi *Corynebacterium diphtheriae*

Menurut *Microbe Profile* (Hoskisson, 2018), *C. diphtheriae* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

| | |
|----------|--------------------------------------|
| Kingdom | : Bacteria |
| Phylum | : Actinobacteria |
| Order | : Actinomycetales |
| Suborder | : Corynebacterineae |
| Famili | : Corynebacteriaceae |
| Genus | : <i>Corynebacterium</i> |
| Spesies | : <i>Corynebacterium diphtheriae</i> |

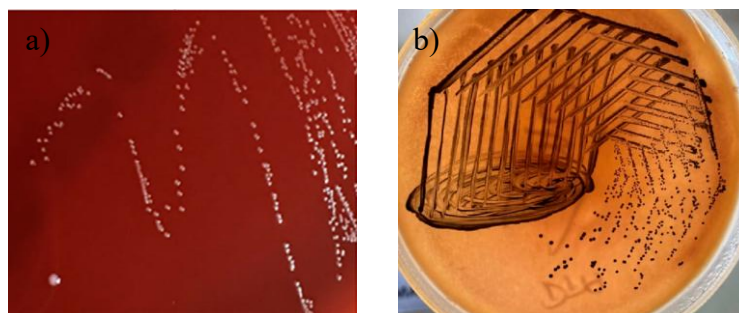
b. Sifat dan karakteristik *Corynebacterium diphtheriae*

1) Morfologi koloni

Corynebacterium diphtheriae diklasifikasikan menjadi biotipe (mitis, intermedius, dan gravis) berdasarkan morfologi koloni, serta menjadi lisotipe berdasarkan sensitivitas terhadap korinebakteriofag. Sebagian besar galur (strain) membutuhkan asam

nikotinat dan pantotenat untuk pertumbuhan, beberapa juga membutuhkan tiamin, biotin, atau asam pimelat. Untuk produksi toksin difteri yang optimal, media harus dilengkapi dengan asam amino (Kambang dkk., 2023).

Pada medium *blood agar*, koloni *Corynebacterium diphtheriae* berukuran kecil dengan diameter 1-3 mm, bergranular dan putih abu-abu dengan tepi tidak beraturan. Selain itu bakteri ini dapat tumbuh lebih baik pada media selektif seperti *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA), dimana dalam media ini terdapat kalium tellurite yang akan direduksi menjadi tellurium sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri flora normal tenggorokan selain itu dapat juga dimetabolisme oleh bakteri sehingga ciri koloni tampak berwarna hitam dan dapat membedakan bakteri *C. diphtheria* dengan bakteri lain (Annizar, 2018).



Gambar 1. Koloni *Corynebacterium diphtheriae*. a) Pada media *Blood Agar* (BA) (Mitchell dan Markantonis, 2025), b) Pada media *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA) (Jamir dkk., 2022)

2) Morfologi sel

Corynebacterium diphtheria pada pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan pewarnaan gram bakteri akan tampak berwarna ungu kebiruan, coccobacillus pleomorfik (batang bervariasi), Gram-positif, memiliki diameter 0,5-1 um. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif, non-motil, tidak membentuk spora, tidak berkapsul, menghasilkan toksin, dan biasanya berbentuk gada (ujung mebesar) dengan karakteristik morfologi bakteri seperti huruf “V”, “Y” atau palisade “karakter Cina” yang khas. Ketika diwarnai dengan pewarnaan Neisser pada *granules* ujung dari bakteri akan berwarna gelap (*metachromatic granules*) sehingga basilnya memiliki bentuk seperti manik-manik.



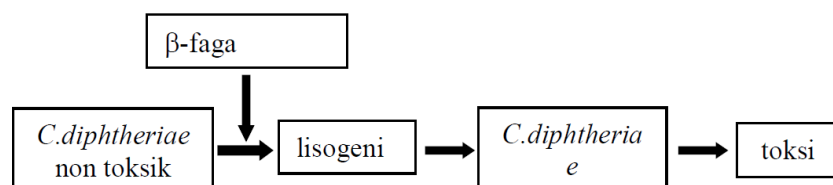
Gambar 2. Mikroskopik Bakteri *Corynebacterium diphtheria* (Ridwan dan Rizki, 2020)

c. Virulensi bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

Faktor virulensi utama *C. diphtheriae* adalah toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin). Toksin yang diproduksi oleh bakteri masuk ke aliran darah, menyebar ke seluruh tubuh, dan merusak organ

seperti jantung, hati, dan sistem pernafasan (Prygiel dkk., 2024). Sintesis toksin difteri oleh bakteri *C. diphtheriae* dikode oleh gen *tox* atau *dtx* (*diphtheria toxin*) dan diregulasi oleh gen *dtxR*. Gen *tox* dibawa oleh sejenis bakteriofaga yang disebut β -faga yang kemudian masuk ke dalam kromosom bakteri melalui proses lisogenik (Sunarno dkk., 2020).

Berdasarkan kemampuan menghasilkan toksin *C. diphtheriae* dapat dibedakan menjadi 2, yaitu strain *C. diphtheriae* toksigenik yang mampu menghasilkan atau memproduksi toksin difteri dan strain *C. diphtheriae* non-toksigenik yang tidak menghasilkan toksin. Selain itu ada yang dikenal dengan istilah strain *nontoxigenic tox-gene bearing* (NTTB) yaitu merupakan bakteri yang secara genetik memiliki gen pengkode sintesis toksin (gen *tox*) tetapi tidak terekspresi sehingga tidak menghasilkan toksin. Jika terjadi proses lisogenik yaitu strain non-toksigenik terinfeksi oleh β -faga maka, gen *tox* akan terinsersi ke dalam kromosom bakteri dan mempengaruhi perilaku bakteri tersebut yang pada awalnya bersifat non-toksigenik akan menjadi toksigenik (Sunarno dan Sariadji, 2020).



Gambar 3. Peranan β -faga dalam virulensi *Corynebacterium diphtheriae* (Rusmana dkk., 2020)

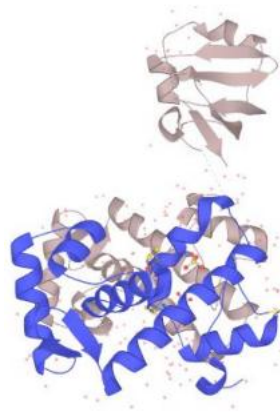
Untuk menghasilkan toksin difteri bakteri *C. diphtheriae* memiliki dua faktor yang mempengaruhi, pertama yaitu kadar Fe ekstraseluler yang rendah dan keberadaan profaga pada kromosom bakteri yang didapat melalui siklus lisogenik. Toksin akan disintesis dalam jumlah yang besar hanya setelah persediaan Fe ekstraseluler menipis. Molekul represor yang aktif mengikat *tox gene* pada posisi menempel kemudian akan menghambat transkripsi gen tersebut. Jika Fe kurang atau tidak dimiliki oleh molekul represor maka terjadilah derepresi, molekul represor menjadi inaktif dan transkripsi *tox gene* berjalan. Fe dianggap sebagai korepresor karena dibutuhkan dalam proses penekanan produksi *tox gene* (Rusmana dkk., 2020).

2. Gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR)

Diphtheria Toxin Repressor (dtxR) adalah protein pengatur global yang menggunakan Fe^{2+} sebagai ko-represor, gen ini terdapat pada kromosom bakteri *C. diphtheriae*, dan merupakan gen yang terdapat pada bakteri *C. diphtheriae* toksigenik maupun non-toksigenik (Sun dkk., 2024).

Produk protein *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) mampu mengikat *operator tox*, sehingga dapat memblokir transkripsi. Gen dtxR diaktifkan oleh logam berat, terutama ion besi. Jika tidak terdapat ion besi, apo-dtxR ada sebagai monomer tidak aktif yang berada dalam kesetimbangan lemah dengan bentuk dimer. Setelah diaktifkan dengan adanya ion logam, dtxR membentuk dimer yang stabil dan dua pasang dimer yang dapat mengikat *sekuens operator tox*. dtxR terdiri dari dua

domain struktural utama yang dihubungkan oleh penghubung fleksibel yang mengandung daerah kaya prolin. Domain N-terminal mengandung situs pengikatan ion logam tambahan dan utama, Setelah dimer dtxR mengikat *promotor tox* , transkripsi *tox* ditekan. Jika besi terbatas, bentuk dtxR yang tidak berikatan tidak mampu mengikat DNA, sehingga menyebabkan induksi toksin difteri (Prygiel dkk., 2022).



Gambar 4. Struktur 3-D protein dtxR gen divisualisasi oleh Litemol (Nastiti dan Kuncara, 2023)

Sekarang ini *C. diphtheriae* non-toksigenik juga dapat menjadi masalah kesehatan masyarakat, potensi strain non-toksigenik dengan mudah dapat menjadi menjadi toksigenik melalui lisogenisasi oleh bakteriofag pengkode toksin. infeksi oleh strain non-toksigenik dapat menyebabkan gejala parah pada manusia seperti lesi kulit, miokarditis, dan artritis septik (Moller dkk., 2021). Oleh karena itu selain pemeriksaan toksigenitas gen *tox/dtx* bakteri *C. diphtheriae* diperlukan juga pemeriksaan gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) karena gen ini dapat mendeteksi keberadaan bakteri bakteri *C. diphtheriae* toksigenik dan non-toksigenik .

3. Pemeriksaan laboratorium deteksi bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

a. Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan Mikroskopik untuk bakteri *Corynebacterium diphtheriae* terdiri dari pewarnaan gram, pewarnaan albert, dan pewarnaan neisser. Tujuan dari masing-masing pewarnaan berbeda, pewarnaan gram untuk melihat sifat gram dan morfologi bakteri, pewarnaan albert dan neisser untuk melihat granul metakromatik pada bakteri *C. diphtheriae*. Pewarnaan albert khusus untuk melihat granul metakromatik, dengan pewarnaan ini bakteri akan berwarna hijau dengan granul berwarna gelap. Dengan pewarnaan neisser granul akan terlihat berwarna biru gelap. Pemeriksaan mikroskopik ini tidak dapat digunakan untuk diagnostik hanya digunakan sebagai pemeriksaan penunjang (Kemenkes, 2019).

b. Kultur dan Identifikasi

Pada metode kultur yang digunakan yaitu biakan dari media primer dan kemudian koloni yang tumbuh dilakukan identifikasi dan *biotipe* menggunakan metode konvensional dengan uji biokimia atau semi otomatis tergantung fasilitas yang tersedia di laboratorium. Media primer yang biasa digunakan yaitu media *Blood Agar* (non-selektif), kemudian digunakan juga media selektif untuk bakteri *Corynebacterium diphtheriae* seperti media *Hoyle's*, media *Telurite Blood Agar*, dan media *Tinsdale*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah didapatkan hasil spesies dan varian,

kemudian akan diuji molekuler (Kemenkes, 2019).

c. Pemeriksaan Toksigenitas

Gold standard untuk pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* adalah dengan metode konvensional (Elek test, Guinea pig dan *vero cell cytotoxigenicity*), namun dalam pelaksanaannya, teknik tersebut tidak selalu bisa dilaksanakan karena membutuhkan waktu yang lama, masalah ketersediaan bahan, keterbatasan kemampuan teknisi, memerlukan biaya yang sangat tinggi dan hanya dapat dilakukan di laboratorium tertentu. Oleh karena itu, salah satu alternatif pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* adalah Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dimana menurut Sunarno dan Sariadji (2020) Gen *dtx* dan *dtxR* dapat digunakan sebagai marker (gen target) dalam metode deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* menggunakan PCR Multipleks sehingga menjadi alternatif metode diagnosis difteri yang cepat dan akurat (Sunarno dan Sariadji, 2020).

4. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

a. Pengertian PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik biologi molekuler yang memungkinkan untuk memperbanyak fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan enzim DNA *polymerase* yang bersifat termotabil (Widodo, 2025). Teknik PCR pertama kali ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1984 dan terus mengalami perkembangan sehingga menjadi salah satu metode paling revolusioner

dalam bidang ilmu kedokteran dan biologi. Saat ini teknik PCR digunakan dalam berbagai analisis seperti di bidang diagnosis klinis penyakit menular dan genetik, analisis forensik, analisis genetika, dan mikrobiologi (Marta, 2021).

PCR merupakan salah satu teknologi dengan sensitivitas tinggi, sehingga dapat digunakan untuk mengamplifikasi suatu fragmen DNA dalam jumlah yang sangat kecil dengan cepat, akurat dan menghasilkan dua kali lipat DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok skuen gen. Dengan PCR banyak metode dalam bidang biologi molekuler yang dapat dipersingkat. PCR sering digunakan untuk mendeteksi patogen penyebab suatu penyakit seperti virus, bakteri dan jamur (Kharisma, 2020).

b. Prinsip dasar PCR

Prinsip dasar PCR yaitu secara *in vitro* terjadi sintesis dari suatu sekuen DNA yang spesifik secara enzimatik, dengan menggunakan pasangan primer oligonukleatida. Templet yang digunakan untuk beberapa siklus amplifikasi selanjutnya merupakan untai DNA baru yang dihasilkan dan urutan DNA target akan teramplifikasi secara selektif pada siklus-siklus berikutnya (Marta, 2021).

Umumnya tahap penting dalam proses PCR dilakukan antara 30–40 siklus. Menurut Widodo (2025) Teknik PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu denaturasi, annealing, dan Extension/elongasi, yang

dilakukan dalam beberapa siklus hingga jumlah DNA yang cukup diperoleh untuk dianalisis.

1) Denaturasi

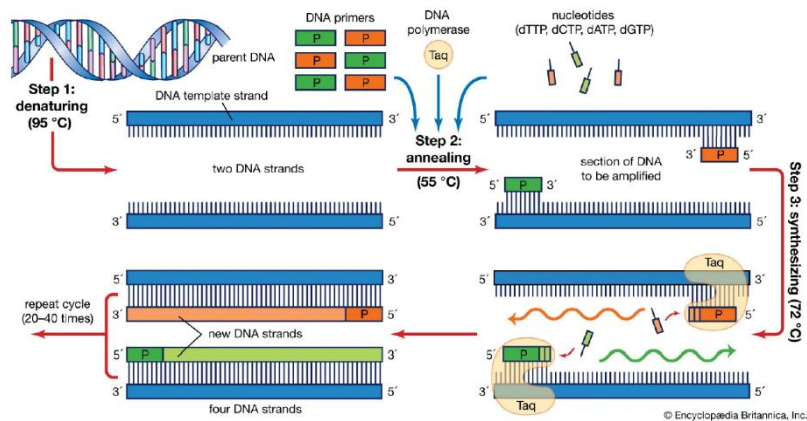
Denaturasi adalah proses pembukaan untai ganda DNA menjadi untai tunggal dengan menggunakan panas 95°C. Panas yang tinggi akan memotong ikatan hydrogen pada DNA. Proses Denaturasi berlangsung sekitar 1-2 menit (Khalil, 2021).

2) *Annealing*

Primer *annealing* merupakan pengenalan suatu primer terhadap DNA target. selama *annealing* primer akan menempel pada sekuens DNA. Primer akan menempel pada lokasi tertentu pada DNA template untai tunggal melalui ikatan hidrogen (suhu yang tepat tergantung pada suhu T_m primer yang digunakan). Penempelan primer pada urutan nukleotida yang sesuai terjadi pada suhu 55°C - 60°C (Khalil, 2021).

3) Extension/Elongasi

Extension adalah tahapan ketiga dalam proses PCR, suhu yang digunakan pada extension adalah 72°C. Selama tahapan ini DNA Polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerasi, rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hydrogen dengan DNA cetakan (Khalil, 2021).



Gambar 5. Siklus dalam PCR (Hidayat, 2020)

c. Jenis-jenis PCR

Menurut Hidayat (2020) PCR memiliki beberapa jenis yaitu:

1) *Quantitative PCR* (qPCR)

qPCR merupakan jenis PCR yang digunakan untuk mengukur kuantitatif urutan target. PCR ini memiliki tingkat presisi yang tinggi biasanya juga digunakan untuk menentukan urutan DNA yang ada di dalam sampel dan salinannya. Metode qPCR menggunakan pewarna fluoresen.

2) *Reverse Transcription PCR* (RT-PCR)

PCR jenis ini merupakan prosedur dua langkah yang melibatkan pembuatan salinan cDNA dari mRNA, kemudian menggunakan PCR untuk amplifikasi cDNA dengan menggunakan *Reverse transcriptase*. RT-PCR banyak digunakan untuk ekspresi gen dan penghentian transkripsi.

3) *Nested PCR*

Nested PCR menggunakan dua pasang primer amplifikasi dan dua putaran PCR. Dua set primer digunakan dalam dua putaran amplifikasi berurutan dengan dua pasang primer berbeda yang menargetkan lokus yang sama tetapi dengan situs penempelan bertingkat.

4) *Multiplex-PCR*

Jenis ini terdiri dari beberapa set primer yang dalam satu campuran PCR dan berfungsi dalam menghasilkan berbagai ukuran ampikon yang khusus digunakan untuk urutan DNA yang berbeda.

5) *Inverse PCR*

Inverse PCR adalah amplifikasi gen target yang menggunakan informasi urutan tidak lengkap dengan syarat merupakan urutan bagian dari molekul DNA yang Panjang, seperti kromosom. Pada PCR ini target molekul DNA diubah menjadi lingkaran.

6) *Hot start PCR*

PCR ini merupakan Teknik yang dapat mengurangi amplifikasi non-spesifik selama tahap penyimpanan awal PCR. Jenis ini dapat dilakukan secara manual dengan melakukan pemanasan pada komponen reaksi ke suhu denaturasi sebelum menambahkan polimerase.

7) *Intersequence-specific* PCR (ISSR)

PCR ini digunakan untuk DNA fingerprinting yang dapat mengamplifikasi region diantara skuens DNA pendek yang berulang agar menghasilkan skuens fingerprint yang unik, yang kemudian fragmen ini diamplifikasi.

8) *Single Specific Primer*-PCR (SSP-PCR)

SSP-PCR ini merupakan PCR yang memungkinkan amplifikasi untuk DNA untai ganda walaupun informasi skuens hanya ada di satu ujung. Sehingga metode ini memungkinkan genom searah dari daerah kromosom yang diketahui ke daerah yang tidak diketahui.

d. Komponen *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Menurut Widodo (2025) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memiliki 4 komponen utama yaitu DNA cetakan, primer, DNA polymerase dan *Deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP). Selain 4 komponen utama dalam proses PCR terdapat juga komponen yang berperan penting yaitu buffer PCR, Mg^{2+} dan *thermal cycler* (Praningsih, 2025).

1) DNA cetakan

DNA cetakan (DNA template) merupakan DNA yang nantinya akan diperbanyak dan berfungsi untuk pembentukan DNA baru yang sama selama proses PCR. DNA cetakan biasanya berasal dari hewan, manusia, tumbuhan, jamur, virus, bakteri atau

complementary DNA. DNA cetakan harus dihindari dari kontaminan DNA berupa RNA, DNA atau protein lain (Modi dkk., 2021).

2) Primer

Primer adalah salah satu komponen yang penting dalam proses PCR. Primer merupakan suatu polimer asam nukleat pendek (oligonukleotida) berukuran 18-30 basa yang diperlukan sebagai titik pelekatan enzim DNA polimerase pada proses pembentukan atau pemanjangan DNA suatu gen spesifik secara *in vitro*. Dalam analisis PCR, terdapat 2 primer yang digunakan yaitu *forward primer* dan *reverse primer*. Kedua primer tersebut mengapit fragmen DNA target, membatasi Panjang DNA yang akan diperbanyak (Astari dkk., 2021).

3) DNA *polymirase*

DNA polymerase merupakan enzim yang digunakan dalam proses PCR, fungsinya yaitu untuk mengkatalisis sintesis untai DNA baru dengan cara menambahkan nukleotida ke ujung 3' dari untai DNA yang sudah ada. Enzim ini menentukan dan memastikan nukleotida yang ditambahkan komplementer dengan DNA cetakan. DNA polymerase digunakan dalam PCR karena strukturnya stabil di suhu tinggi. Salah satu contohnya yaitu Taq polymerase yang masih stabil di suhu 97°C (Widodo, 2025).

4) *Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP)*

Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) merupakan molekul berperan sebagai building block dalam replikasi DNA. dNTP terdiri dari gula deoksiribosa, basa nitrogen (adenin (A), sitosin (S), guanin (G), atau timin (T)), serta terdapat tiga gugus fosfat. Ada empat jenis dNTP yaitu dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. dNTP menyediakan komponen yang diperlukan oleh enzim DNA polymerase untuk memperpanjang untai DNA selama siklus PCR. (Mahanama dan Davies, 2021).

5) PCR buffer dan Mg^{2+}

Reaksi PCR hanya akan terjadi jika kondisi pH sesuai. Untuk itu diperlukan buffer untuk proses PCR, fungsinya untuk menjamin pH medium. Selain itu diperlukan juga Mg^{2+} yang berasal dari $MgCl_2$ dan bertindak sebagai kofaktor yang memiliki fungsi untuk mengstimulasi aktivitas DNA polimerase (Praningsih, 2025).

6) *Thermal cycler* (Mesin PCR)

Thermal cycler merupakan salah satu komponen yang juga penting dalam proses PCR dimana *Thermal cycler* merupakan suatu alat yang dipergunakan melalui pengaturan suhu dan penggunaan enzim tahan panas tinggi untuk mengamplifikasi atau menggandakan untai dari basa-basa DNA. Mesin ini bekerja secara otomatis selama proses amplifikasi, sesuai dengan permintaan pengaturan suhu untuk tahap denaturasi, *annealing*

maupun ekstensi/elongasi (Ambara dkk., 2024).

e. Keunggulan dan kelemahan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) memiliki keunggulan yaitu mampu menyediakan hasil deteksi yang spesifik dan sensitif atas DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) dan RNA (*Ribonucleic Acid*) dari patogen. Dalam konteks klinis, PCR telah digunakan untuk deteksi cepat patogen seperti virus dan bakteri penyebab penyakit (Dwi dkk., 2024). Hasil biasanya diperoleh dalam beberapa jam, sampel yang digunakan untuk memulai reaksi relatif lebih sedikit minimal 1 hingga 100 ng DNA atau RNA. PCR dapat memperbanyak 10^6 hingga 10^9 salinan DNA dalam waktu singkat (Khehra dkk., 2025).

Sedangkan kekurangan dari metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu harus diawali dengan preparasi sampel yang rumit, reagen *Polimerase Chain Reaction* (PCR) yang digunakan relatif mahal, selain itu hasilnya tidak dapat dilihat secara langsung (Setia dkk., 2020). Metode PCR juga memerlukan peralatan yang canggih, tenaga yang ahli serta laboratorium yang memadai untuk mengurangi kontaminasi, karena kontaminasi sekecil apapun dapat menghasilkan produk amplifikasi yang tidak diharapkan yang dapat mengakibatkan kesalahan dalam proses pemeriksaan (Praningsih, 2025).

5. Perancangan Primer

Perancangan primer merupakan langkah awal yang sangat penting dalam proses amplifikasi dan analisis segmen DNA menggunakan PCR

karena primer tersebut yang akan berhibridisasi pada DNA template dan mengamplifikasi DNA target.

a. Metode perancangan primer untuk PCR

Perancangan primer dilakukan untuk memperoleh primer yang dapat digunakan dalam amplifikasi DNA dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung dari ketepatan primer yang digunakan. Primer yang digunakan dalam proses PCR harus dapat membatasi daerah yang akan diamplifikasi (Pradnyaniti dan Yowani, 2022).

Bioinformatika merupakan suatu bidang interdisipliner yang secara luas dapat didefinisikan sebagai gabungan antara ilmu biologi (biologi molekuler) dan komputasi dengan melibatkan bantuan komputer dan software. Salah satu peran dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuen primer secara *In silico* (Sharma, 2023).

Studi *in silico* secara umum memanfaatkan basis data yang tersedia untuk dijadikan objek penelitian. Penelitian menggunakan PCR secara *in silico* dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan pasangan primer secara teoritis dan bisa memperkuat fragmen gen yang ditargetkan menggunakan acuan sekuen yang ada di database. Oleh karena itu penggunaan web dan software seperti Primer-BLAST, Primer3Plus (Nurul dan Sri, 2025), IDT, Clone 9 Manager, PRIMER, dan FastPCR sangat direkomendasikan (Sharma, 2023).

b. Pemilihan target gen untuk perancangan primer

Pemilihan target sangat penting untuk mendapatkan amplifikasi fragmen gen target, maka keberhasilan amplifikasi sangat tergantung pada pemilihan primer yang tepat dan pada saat proses PCR yaitu tahap *annealing* (penempelan) primer pada DNA. Primer yang baik adalah primer yang spesifik. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi (Hafzari dkk., 2024).

Analisis data sekuens gen dapat dilakukan dengan *Multiple sequence alignment* (MSA). Dengan MSA ini informasi mengenai tingkat konservatif *base pair* pada gen dapat dijadikan acuan dalam menentukan posisi penempelan primer. MSA optimal memiliki banyak kesamaan dan kemiripan sekuens selain itu juga memiliki kesamaan fungsi. Proses *alignment* dapat dilakukan dengan menggunakan *software* MAFFT, CLUSTAL, BioEdit, dan MEGA (Praningsih, 2025).

c. Kriteria primer yang optimal

Menurut Aulia (2024) untuk mendapatkan primer yang baik dan optimal membutuhkan beberapa kriteria yaitu:

1) Panjang primer

Primer yang digunakan dalam satu kali PCR yaitu sebanyak dua jenis primer, yaitu primer forward dan primer reverse. Panjang primer ideal umumnya berkisar antara 18-30 basa sehingga primer

bisa berhibridisasi dengan sekuen target pada suhu *annealing* dengan baik. Primer yang memiliki jumlah basa yang terlalu pendek kurang dari 18 dapat mengalami penempelan primer ditempat lain yang tidak diinginkan. Sedangkan panjang primer lebih dari 30 basa menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik pada DNA target.

2) Komposisi primer

Primer yang didesain harus menghindari urutan dinukleotida yang sama (repeats) dan pengulangan (runs) lebih dari empat basa dengan basa yang sama karena dapat menurunkan spesifitas dan meningkatkan kemungkinan terjadinya mispriming atau primer PCR menempel pada urutan DNA yang salah. Secara umum, run dan repeat yang ditoleransi maksimal berjumlah empat dengan persentase kandungan guanin dan sitosin dalam primer sebanyak 40% sampai 60% karena jika terlalu rendah diperkirakan tidak akan bisa secara efektif menempel pada target yang diinginkan sehingga efisiensi proses PCR menjadi menurun, sedangkan kandungan GC yang tinggi akan meningkatkan suhu T_m serta suhu *annealing* PCR.

Beberapa program desain primer mensyaratkan pasangan primer yang didesain mengandung basa G dan C pada 5 basa terakhir di ujung 3' untuk membantu primer berikatan secara spesifik dengan template. Akan tetapi, hanya maksimal 3 basa G atau C yang diperlukan untuk menghindari ujung 3' melipat membentuk struktur

dimer yang bisa mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada template.

3) *Melting temperature* (T_m)

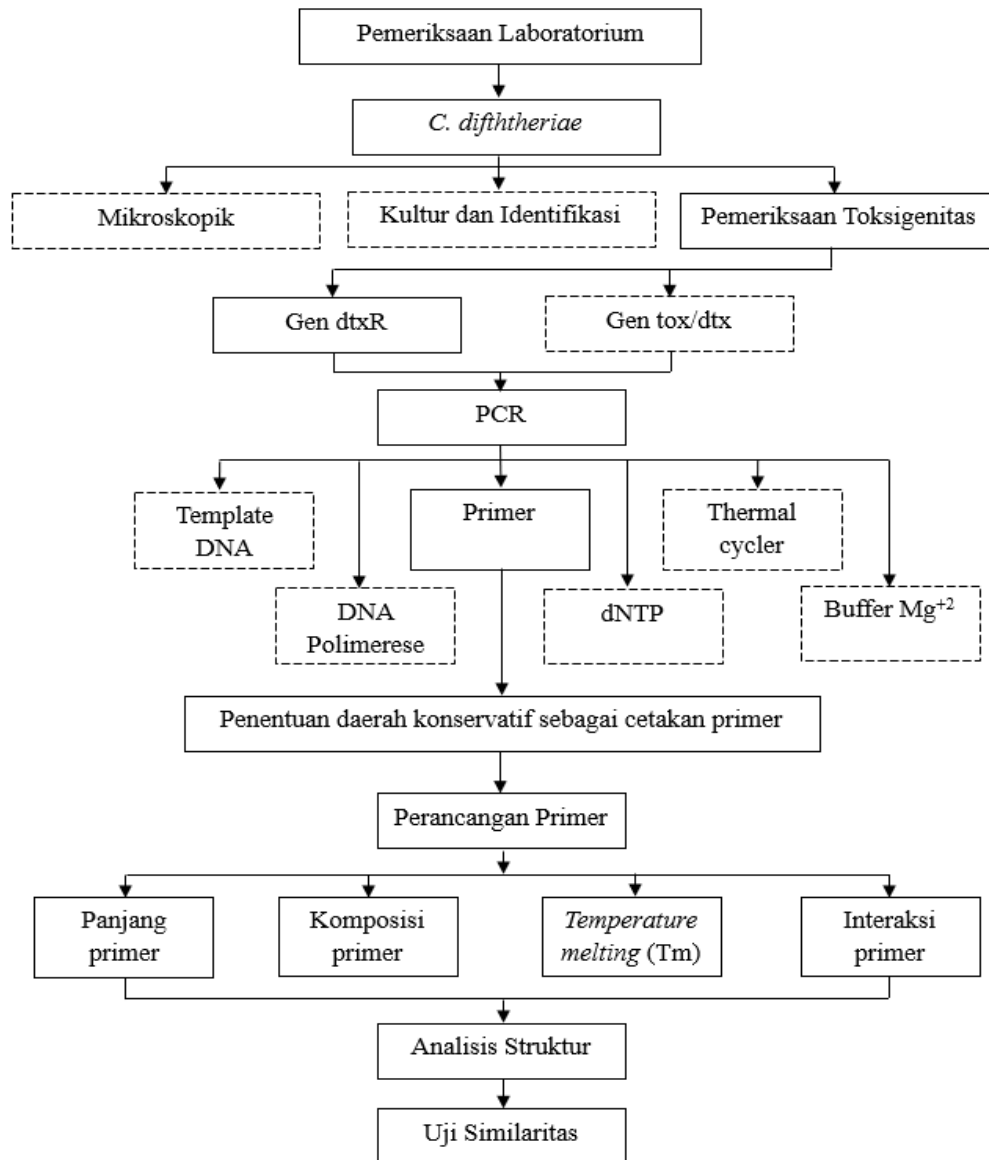
Suhu T_m diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi atau lepas ikatan sehingga primer bisa mengenali DNA targetnya yang komplementer. Melting temperature mempengaruhi proses PCR dimana suhu leleh yang terlalu tinggi mengakibatkan rendahnya tingkat hibridisasi primer dengan template sehingga menurunkan efisiensi dari reaksi PCR. Selisih suhu leleh pada pasangan primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C untuk proses amplifikasi yang baik. Secara teoritis T_m suatu primer dapat ditentukan dengan rumus $[2(A+T) + 4(G+C)]$. Nilai T_m berkisar antara 50-62°C. T_m mengindikasikan stabilitas hibrida sehingga juga menentukan suhu penempelan dalam PCR.

4) Interaksi primer-primer

Reaksi PCR sebaiknya terbebas dari struktur sekunder seperti *hairpin*, *selfdimer* dan *hetero-dimer*. *Hairpins* merupakan interaksi intramolekuler dalam primer yang menempel pada dirinya sendiri sehingga membentuk struktur sekunder. *Hairpins* dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada template. *Self Dimer* terjadi apabila terbentuk ikatan pada dua primer yang sejenis. Primer yang berikatan dengan primer pasangannya disebut sebagai *hetero-dimer*. Struktur *dimer* yang terbentuk pada produk

PCR dapat terjadi karena primer memiliki banyak basa komplementer. Jika ikatan *dimer* ini terlalu kuat, akan mengganggu proses perpanjangan DNA dan akan menghasilkan konsentrasi DNA yang rendah.

B. Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka teori

Keterangan :

: Diteliti

: Tidak diteliti

C. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana daerah konservatif dari urutan gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*?
2. Bagaimana rancangan kandidat pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*?
3. Bagaimana struktur sekunder pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*?
4. Bagaimana tingkat similaritas pasangan primer yang telah dirancang dalam mengamplifikasi gen *Diphtheria Toxin Repressor* (dtxR) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*?