

DESAIN PRIMER SECARA *IN SILICO* UNTUK AMPLIFIKASI GEN *COA* PADA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DENGAN *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Rhadevka Agnur Saputra dan Didik Wahyudi*

Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional,
Jl. Solo Baki Kwarasan, Sukoharjo, Jawa tengah, Indonesia

*e-mail korespondensi : didik.wahyudi@stikesnas.ac.id

ABSTRAK: *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab berbagai infeksi kulit dan jaringan lunak serta penyebab penyakit yang lebih serius dan lebih invasif. Gen *coa* adalah gen penyandi enzim koagulasi yang dimiliki *Staphylococcus aureus*. Gen *coa* dapat dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR memerlukan sepasang primer. Primer dapat didesain secara *in silico*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah primer yang digunakan dapat mengamplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus*. Primer didesain menggunakan *software* NCBI kemudian dilakukan uji kualitas primer menggunakan *software oligoevaluator* dan *NetPrimers*. Didapatkan 2 kandidat primer yaitu primer pertama *forward* 5' CAAAGCAGATGCGATAGTGG 3' *reverse* 5' GTTCGCTTTATTTTCCGGCT 3' dan primer kedua dengan *forward* 5' AGCCGGAAAATAAAGCGAAC 3' *reverse* 5' ACCTTGAATTGTGCCTTGTG 3'. Hasil primer yang didesain diujikan dengan metode PCR. Hasil visualisasi kedua primer terbentuk pita DNA yang tebal dan jelas, tidak ada *smear*, namun terdapat primer dimer dan letak produk tidak sesuai dengan hasil analisis secara *in silico*. Primer yang didesain dapat digunakan untuk amplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus*. Terdapat perbedaan spesifisitas antar primer yang didesain dimana primer 2 lebih baik dari primer 1.

Kata Kunci : Desain primer; Gen *coa*; *Staphylococcus aureus*; PCR

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is bacteria that causes of a variety of skin and soft tissue infections and causes more serious and invasive disease. The *coa* gene is a coagulase enzyme gene that belongs to *Staphylococcus aureus*. The *coa* gene can be detected by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique. The PCR method requires primers. Primer can be designed in *silico*. This study aims to determine whether the primer used can amplify the *coa* gene in *Staphylococcus aureus*. Primers were designed using NCBI software and then tested for primary quality using *oligoevaluator* and *NetPrimers* software. Two primary candidates were obtained, namely the first primer *forward* 5' CAAAGCAGATGCGATAGTGG 3' *reverse* 5' GTTCGCTTTATTTTCCGGCT 3' and the second primer *forward* 5' AGCCGGAAAATAAAGCGAAC 3' *reverse* 5' ACCTTGAATTGTGCCTTGTG 3'. The designed primary results were tested by the PCR method. The results of the visualization of the two primers formed thick and clear DNA bands, no smears, but there were dimer primers and the location of the products did not match the results of *in silico* analysis. The designed primer can be used for *coa* gene amplification in *Staphylococcus aureus*. There are differences in specifications between the designed primers where primer 2 is better than primary 1.

Keywords : Primer design; Gene *coa*; *Staphylococcus aureus*; PCR

1. PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen yang sering dijumpai dan merupakan penyebab berbagai infeksi kulit dan jaringan lunak serta penyebab penyakit yang lebih serius dan lebih invasive [1]. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi karena mampu berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan tubuh karena mampu menghasilkan enzim koagulase [2].

Koagulase merupakan protein yang bekerja terhadap fibrinogen inang. Fungsi utama koagulase yaitu untuk mengubah fibrinogen menjadi benang benang fibrin dengan mengaktivasi protrombin secara non-proteolitik yang akan mengalihkan aktivasi protrombin oleh regulasi tubuh inang [3].

Gen penyandi enzim koagulase (*coa*) dapat digunakan sebagai penanda adanya bakteri *Staphylococcus aureus*. Gen *coa* adalah gen penyandi enzim koagulase, diantara genus *Staphylococcus* hanya *Staphylococcus aureus* saja yang memproduksi koagulase sehingga dapat membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* lainnya [2].

Gen *coa* dapat dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni dkk. [2] telah berhasil mendeteksi adanya gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* pada susu sapi murni dengan PCR. Keberhasilan amplifikasi dengan teknik PCR sangat tergantung dengan primer yang digunakan. Primer adalah urutan nukleotida dengan panjang 18-30 bp yang diperlukan pada proses isolasi DNA [4]. Untuk mendapatkan primer dapat dilakukan dengan cara melakukan desain primer. Pembuatan desain primer dilakukan melalui secara *in silico*. *In silico* merupakan studi dengan menggunakan bantuan komputer dan *software* [5].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mengetahui spesifisitas primer yang didesain untuk amplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* dengan PCR.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah media BHI, media NA miring, media MSA, plasma darah 5%, plasma sitrat, agar base, *tissue*, larutan cat gram A, B, C, D, emersi oil, isolate bakteri *Staphylococcus aureus*, *lysozyme*, Gram + buffer, *Proteinase K*, GB buffer, *Elution buffer*, *Etanol Absolute*, W1 Buffer, aquabidest, aquadest, pelarut TBE 1x agarose, *loading dye*, *gel red*, primer *forward*, primer reverse, master mix, dd.H₂O, *R-Nase Free Water*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya Erlenmeyer, mikroskop, autoclave, cawan petri, tabung reaksi, ohse bulat, inkubator, ohse lurus, objek glass, *collection tube*, kolom GD, centrifuge, 1,5 ml *microcentrifuge tube*, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, *micropipet*, *vortex*, rak tabung, waterbath, kulkas, spektrofotometer UV – VIS, *agar case*, *magnetic stirrer*, *chamber elektroforesis*, elektroforesis gel agarose, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Thermal Cycler Machine T100*, *Biorad UV – Transilluminator Gel Doc*.

2.2 Metode

Tahapan prosedur penelitian ini yaitu pembuatan media, identifikasi *Staphylococcus aureus*, pembuatan standart kekeruhan *MC Farland* 0,5, pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*, isolasi DNA menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid Biotech, Taiwan), uji kualitatif DNA, uji kuantitatif DNA, pembuatan desain primer, optimasi suhu *annealing* PCR, dan PCR.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil karakterisasi kultur murni *Staphylococcus aureus* yaitu pengecatan gram, uji hemolisa, uji katalase, uji pigmentasi, uji fermentasi mannitol, uji koagulase. Bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan pengecatan gram dan diamati secara mikroskopis ditemukan bakteri

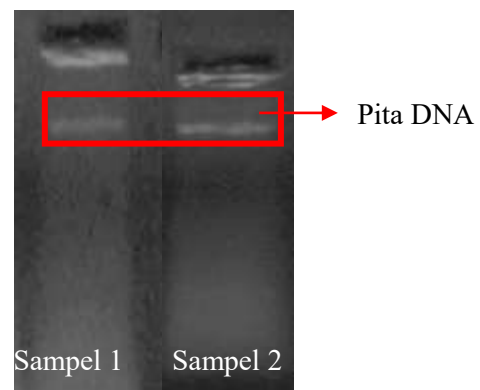
berbentuk bulat, berwarna ungu dengan susunan bergerombol. Uji hemolisa pada media BAP menunjukkan adanya zona hemolisis disekitar koloni. Uji katalase menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya gelembung gas. Uji pigmentasi pada media NA miring menunjukkan warna koloni kuning emas. Uji koagulase menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya aglutinasi. Berdasarkan hasil karakterisasi *Staphylococcus aureus* dapat disimpulkan bahwa sampel merupakan benar kultur murni *Staphylococcus aureus*.

Isolasi DNA *Staphylococcus aureus* dilakukan menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* dengan berbagai tahapan yaitu persiapan sampel, lisis DNA, pengikatan DNA, Pencucian DNA, dan elusi DNA. Hasil DNA yang terekstraksi dapat dilihat melalui uji kualitatif DNA dengan elektroforesis gel agarosa.

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan alat elektroforesis gel agarosa. Bahan yang digunakan pada tahap uji kualitatif DNA meliputi *gel red*, *loading dye*, dan isolat DNA. Untuk melihat keberhasilan ekstraksi DNA diamati dengan alat *Gel Doc*. DNA yang berhasil terekstraksi ditandai dengan terbentuknya pita DNA. Hasil uji kualitatif DNA dapat dilihat pada Gambar 1 dimana DNA dari sampel 1 dan sampel 2 berhasil terekstraksi yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA. Hasil uji kualitatif DNA yang baik ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA tidak ada *smear* [6].

Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan menggunakan alat *Spektrofotometer UV VIS*. Bahan yang digunakan pada tahap uji kuantitatif DNA adalah isolat DNA dan *buffer* TE 1X. Isolat DNA yang digunakan dilakukan pengenceran sebanyak 150X. Kemudian dilakukan pembacaan pada *Spektrofotometer UV VIS* dengan absorbansi λ_{260} dan λ_{280} . Uji Kuantitatif dilakukan untuk mengetahui kemurnian DNA dan konsentrasi DNA. DNA yang berkualitas baik harus memiliki konsentrai diatas 100 ng/ μ L dan nilai kemurnian 1,8-2,0 sehingga dapat disimpulkan bahwa

kedua isolat DNA memiliki konsentrasi yang baik tetapi memiliki nilai kemurnian yang rendah [7]. Hasil uji kuantitatif DNA dapat dilihat pada Tabel 1. Kedua isolat DNA memiliki konsentrasi yang tinggi namun memiliki kemurnian yang rendah karena hanya mempunyai kemurnian berturut-turut sebesar 1,2 dan 1,3 untuk sampel 1 dan sampel 2 yang mengindikasikan adanya kontaminasi oleh protein dan polisakarida [7].



Gambar 1. Hasil uji kualitatif DNA sampel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif DNA

Sampel	Abs λ_{260}	Abs λ_{280}	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
1	0.219	0.182	1,2	1642.5
2	0.232	0.176	1.3	1740

Pada penelitian ini primer yang didesain merupakan primer dari gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* yang dapat diakses dari *GeneBank* dengan ID 66838528. Desain primer dibuat dengan *software* NCBI, selanjutnya pasangan primer diuji kualitasnya dengan *software oligoevaluator*, dan *NetPrimers*. Analisis kandidat primer dilakukan untuk mendapatkan 2 pasang primer terbaik yang memenuhi kriteria. Analisis kandidat primer dilakukan dengan memperhatikan kriteria primer yang baik antara lain primer yang baik berkisar antara 18-30 pasang basa. Primer yang terlalu pendek akan

Tabel 2. Kandidat Primer yang Didesain dengan *Software* NCBI

No	Primer	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Produk Size
1.	Forward	CAAAGCAGATGCGATAGTGG	20	56,97	50.00	781
	Reverse	GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT	20	57,09	45.00	
2.	Forward	ATGCGAGAGAATTAAGGGCA	20	56,99	45.00	880
	Reverse	GCGTTTGTCTCACTTGGTTT	20	57,16	45.00	
3.	Forward	GCCGGAAAATAAAGCGAACT	20	57,09	45.00	618
	Reverse	TATTCACGGATAACCAGTGCC	20	57.10	50.00	
4.	Forward	AGCCGGAAAATAAAGCGAAC	20	57,09	45.00	257
	Reverse	ACCTTGAATTGTGCCTTGTG	20	56,82	45.00	
5.	Forward	ATGCGATAGTGGGTAAGGAC	20	56,80	50.00	774
	Reverse	AGTTTCGCTTTATTTTCCGGC	20	57,09	45.00	
6.	Forward	AAACCAAGTGAGACAAACGC	20	57,16	45.00	462
	Reverse	AGTTGCAGTACCATCTGCAT	20	57,20	45.00	
7.	Forward	TGCGAGAGAATTAAGGGCAA	20	57,22	45.00	452
	Reverse	CACCTTGAATTGTGCCTTGT	20	56,82	45.00	
8.	Forward	GGGATAACAAAGCAGATGCG	20	57,24	50.00	984
	Reverse	CAACTGGAAGTGGTGCTTTT	20	56,82	45.00	
9.	Forward	ACAAGGCACAATTCAAGGTG	20	57.34	45.00	102
	Reverse	GTTGGGAAGTCTGGTCCTTT	20	56.60	50.00	
10.	Forward	CACAAGGCACAATTCAAGGT	20	56,82	45.00	106
	Reverse	ATTGTTGGGAAGTCTGGTCC	20	57,34	50.00	

Tabel 3. Uji Kualitas Primer dengan *Software* Oligoevaluator

No	Primer	Sequence (5'-3')	Run	Secondary Structure	Primer Dimer
1.	Forward	CAAAGCAGATGCGATAGTGG	3	None	No
	Reverse	GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT	4	None	No
2.	Forward	ATGCGAGAGAATTAAGGGCA	3	Weak	No
	Reverse	GCGTTTGTCTCACTTGGTTT	3	None	No
3.	Forward	GCCGGAAAATAAAGCGAACT	4	None	No
	Reverse	TATTCACGGATAACCAGTGCC	2	Weak	No
4.	Forward	AGCCGGAAAATAAAGCGAAC	4	None	No
	Reverse	ACCTTGAATTGTGCCTTGTG	2	None	No
5.	Forward	ATGCGATAGTGGGTAAGGAC	3	None	No
	Reverse	AGTTTCGCTTTATTTTCCGGC	4	None	No
6.	Forward	AAACCAAGTGAGACAAACGC	3	None	No
	Reverse	AGTTGCAGTACCATCTGCAT	2	Strong	No
7.	Forward	TGCGAGAGAATTAAGGGCAA	3	Weak	No
	Reverse	CACCTTGAATTGTGCCTTGT	2	Weak	No
8.	Forward	GGGATAACAAAGCAGATGCG	3	None	No
	Reverse	CAACTGGAAGTGGTGCTTTT	4	Very Weak	No
9.	Forward	ACAAGGCACAATTCAAGGTG	2	Weak	No
	Reverse	GTTGGGAAGTCTGGTCCTTT	3	Weak	No
10.	Forward	CACAAGGCACAATTCAAGGT	2	None	No
	Reverse	ATTGTTGGGAAGTCTGGTCC	3	Weak	No

cenderung mengalami *mispriming* (kesalahan penempelan). Primer yang memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa akan menyebabkan terjadinya hibridasi sehingga akan menghambat proses polimerisasi DNA [8].

Primer yang baik mempunyai persentase G dan C sekitar 40-60%. Tingginya kandungan GC akan mempersulit pemutusan rantai utas ganda pada primer. Sedangkan kandungan GC yang rendah pada primer menyebabkan primer tidak

mampu menempel dan akan berdampak pada penurunan efisiensi PCR [9].

Temperature melting (T_m) yang baik adalah 50 – 65°C. Apabila kurang akan menyebabkan primer menempel ditempat lain sehingga menghasilkan produk yang tidak spesifik. Apabila lebih akan menyebabkan proses amplifikasi tidak berjalan dengan baik [5].

Repeat merupakan pengulangan dua basa yang sama, misal (GAGAGA) yang terdapat pada primer. *Repeat* pada urutan primer dapat menyebabkan *mispriming* pada proses PCR, jumlah repeat yang ditoleransi maksimal berjumlah empat [10].

Hasil desain primer dengan *software* NCBI dapat dilihat pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa didapatkan 10 pasang kandidat primer. Kandidat primer hasil desain oleh *software* NCBI kemudian dianalisis. Kandidat primer yang memenuhi kriteria dianalisa lanjut dengan menguji kualitas primer dengan *software oligoevaluator* yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil uji kualitas primer dengan *software oligoevaluator* tersebut kemudian dilakukan analisa berdasarkan kriteria primer yang baik dimana pasangan primer yang memenuhi kriteria dilanjutkan analisa dengan *software Netprimers* yang dapat dilihat pada Tabel 4 dan didapatkan 2 pasangan primer terbaik yang memenuhi kriteria untuk amplifikasi gen *coa*. Hasil *Blast* NCBI dari kedua pasangan primer tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan suhu optimum yang digunakan untuk PCR. Suhu *annealing* didapatkan dari perhitungan rata – rata primer *forward* dan *reverse* kemudian hasilnya dikurangi 5°C, hal ini dikarenakan suhu *annealing* biasanya dibawah 5°C dari T_m sesungguhnya [11].

Hasil optimasi suhu *annealing* primer 1 dan 2 dapat dilihat pada Gambar 3. yaitu pada keseluruhan suhu dapat mengamplifikasikan gen *coa*, namun terbentuk primer dimer dan letak pita DNA

tidak sesuai dengan analisis secara *in silico* Hal ini dikarenakan perancangan primer tidak spesifik. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran [12]. Suhu optimum yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen *coa* pada primer 1 adalah suhu 46°C, sedangkan suhu optimum pada primer 2 adalah suhu 49°C dimana pada suhu tersebut terbentuk pita DNA yang tebal dan jelas meskipun terdapat primer dimer.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan suhu *annealing* optimum yang sudah diketahui melalui optimasi suhu *annealing*. *Instrument PCR Thermal Cycler* T100 disetting dengan suhu pra denaturasi 95 °C selama 3 menit, suhu denaturasi 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* sesuai suhu optimum yaitu untuk primer 1 adalah 46 °C dan untuk primer 2 adalah 49 °C, suhu ekstensi 72 °C selama 1 menit dan final ekstensi 72 °C selama 5 menit. Hasil amplifikasi isolat DNA 1 dan 2 dapat dilihat pada Gambar 4. yaitu kedua primer dapat mengamplifikasikan gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang tebal dan jelas, tidak ada *smear*, namun terdapat primer dimer dan letak produk tidak sesuai dengan hasil analisis secara *in silico*.

Hasil amplifikasi yang menunjukkan adanya dimer serta letak produk tidak sesuai dengan analisis secara *in silico* ini disebabkan karena primer tidak mengidentifikasi spesies secara spesifik. Dari hasil *Primer Blast* terhadap 2 pasang primer yang terpilih seperti terlihat pada Gambar 2 didapatkan bahwa primer mengamplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus*, selain itu primer juga dapat mengamplifikasi pada *Staphylococcus argenteus* sehingga kedua primer yang didesain merupakan primer yang tidak spesifik. Hal ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Sihotang dkk [13] dimana primer yang didesain ketika dianalisis dengan *Primer Blast* menunjukkan bahwa primer dapat mengamplifikasi 2 spesies yang berbeda

Tabel 4. Uji Kualitas Primer dengan *Software Netprimers*

No	Primer	Sequence (5'-3')	Repeat	Run	Rating
1.	Forward	CAAAGCAGATGCGATAGTGG	-	3	82
	Reverse	GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT	-	4	90
4.	Forward	AGCCGGAAAATAAAGCGAAC	-	4	100
	Reverse	ACCTTGAATTGTGCCTTGTG	-	-	80
5.	Forward	ATGCGATAGTGGGTAAGGAC	-	3	100
	Reverse	AGTTCGCTTTATTTTCCGGC	-	4	80

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAAAGCAGATGCGATAGTGG	20	56.97	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT	20	57.09	45.00	4.00	0.00

Products on target templates

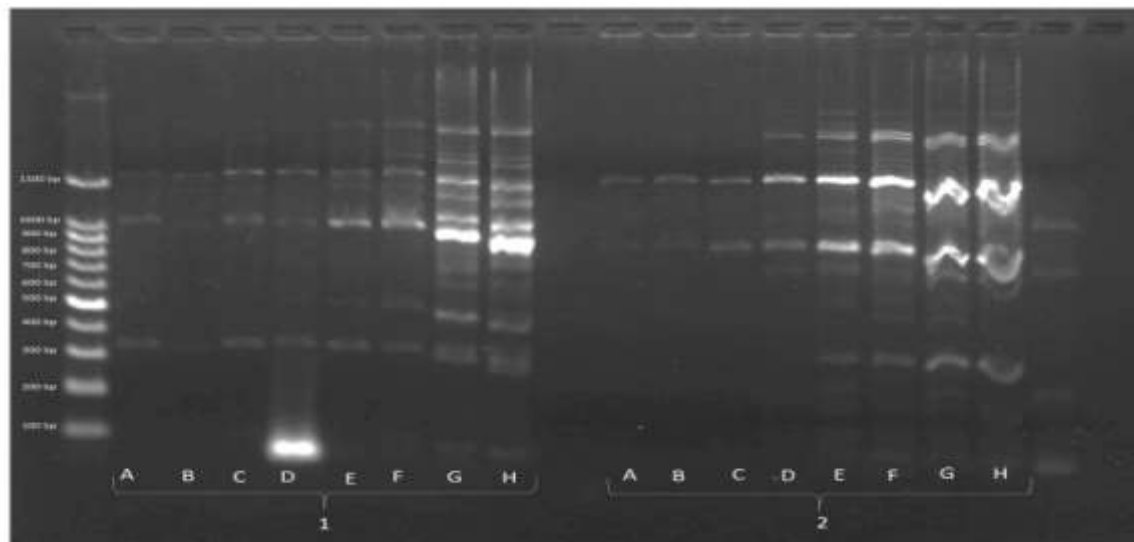
>FR821777.2 Staphylococcus argenteus MSHR1132 complete genome sequence

```
product length = 781
Forward primer 1 CAAAGCAGATGCGATAGTGG 20
Template 236079 ..... 236098
Reverse primer 1 GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT 20
Template 236859 ..... 236840
```

>AB436988.1 Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCS01469

```
product length = 781
Forward primer 1 CAAAGCAGATGCGATAGTGG 20
Template 2476 ..... 2495
Reverse primer 1 GTTTCGCTTTATTTTCCGGCT 20
Template 3256 ..... 3237
```

Gambar 2. Hasil *Blast* NCBI pasangan primer

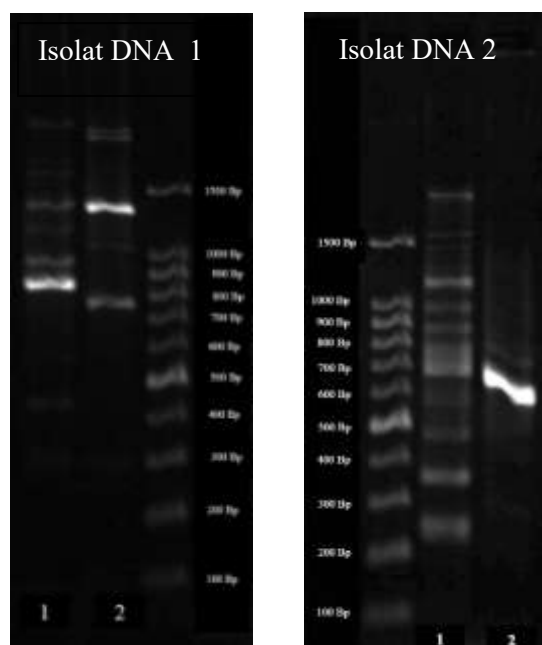


Gambar 3. Elektroforesis hasil optimasi suhu *annealing* primer 1 suhu 53°C (A), 52,4°C (B), 51,6°C (C), 50,4°C (D), 48,7°C (E), 47,3°C (F), 46,6°C (G), 46,0°C (H) dan primer 2 suhu 53°C (A), 52,4°C (B), 51,6°C (C), 50,4°C (D), 48,7°C (E), 47,3°C (F), 46,6°C (G), 46,0°C (H)

sehingga rancangan primer menghasilkan pita yang berbeda dari analisis secara *In Silico*. Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan baik sehingga menyebabkan produk PCR yang tidak spesifik dan atau terbentuknya primer dimer [14]. .

Terdapat perbedaan spesifisitas diantara kedua primer dimana primer 2 memiliki spesifisitas yang lebih baik daripada primer 1 disebabkan karena pada hasil PCR primer 2 menghasilkan pita DNA yang tebal dengan dimer yang lebih sedikit daripada primer 1. Hal ini sesuai dengan analisis secara *in silico* pada

software *Netprimers* bahwa primer 2 memiliki *rating* yang lebih besar dari pada primer 1.



Gambar 4. Amplifikasi DNA dengan PCR

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terhadap desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* dengan PCR yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa kedua pasang primer yang didesain dengan NCBI, *oligoevaluator*, dan *Netprimers* dapat digunakan untuk amplifikasi gen *coa* pada *Staphylococcus aureus* dengan PCR dan terdapat perbedaan spesifitas antar primer yang didesain, dimana primer 2 memiliki spesifitas yang lebih baik daripada primer 1 dikarenakan hasil amplifikasi menghasilkan pita DNA yang jelas dengan dimer yang lebih sedikit daripada primer 1.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang telah memfasilitasi penelitian ini serta pihak – pihak yang membantu pelaksanaan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Delost, D. M. (2015). *Mikrobiologi Diagnostik*. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- [2] Wahyuni, R. A., Darmawati, S., & Prastiyanto, M. E. (2017). Deteksi Gen *coa* Pada *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Susu Sapi Murni. *Jurnal Prosiding Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*.
- [3] Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. In *American Journal of Pathology*, 185 (6), 1518–1527
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>
- [4] Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqram, R., & Jultri, I. al. (2021). Primer Design and Analysis for Detection of *mecA* gene. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(3), 245–253.
<https://doi.org/10.25026/jtpc.v5i3.297>
- [5] Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., & Yowani, S. C. (2018). Desain DNA Primer Secara *In Silico* Sebagai Pendeteksi Mutasi Gen *gyrA* *Mycrobacterium tuberculosis* Untuk Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 6(1), 63–69.
- [6] Hikmatyar, M., Ida Royani, J. (2015). Bioteknologi & Biosains Indonesia Isolasi Dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) Untuk Identifikasi Keragaman Genetik Isolation and amplification of Keladi tikus (*Thyponium flagelliform*) DNA for identification of genetic variation. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 2, 42–48.
- [7] Farmawati, D. A., Nengah Wirajana, I., & Yowani, S. C. (2015). Perbandingan Kualitas DNA Dengan

- Menggunakan Metode Boom Original Dan Boom Modifikasi Pada Isolat Mycobacterium tuberculosis 151. *Jurnal Kimia*, 9, 41–46.
- [8] Anika, M., & Hilda Putri, D. (2019). Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava. *Jurnal Bio Sains*, 4(1): 39–47.
- [9] Sasmito, D. E. K., Rahadian, K., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis*, 5: 94–102.
- [10] Praja & Rosalina. (2021). Perancangan Primer Gen IktB pada *Fusobacterium necrophorum* untuk Analisis PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Pertanian*, 2(2), 47-55.
- [11] Yuenleni. (2019). Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal Of Laboratory*, 1(3), 51-56.
- [12] Aris, M., Sukenda., Harris E., Sukadi, F.M., & Yuhana. (2013). Identifikasi Molekuler Bakteri Patogen dan Desain Primer PCR. *Jurnal Budidaya Perairan*, 1(3), 43-50.
- [13] Sihotang, D. E. A. M., Erwinda, E.Y., Suwarni, E., Lusianti, E. (2021). Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Eruditio*, 1(2), 20-29.
- [14] Yustinadewi, D. P., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). MDR-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques In Pediatric Patient Buffy Coat Samples With LLA. *Jurnal Metamorfosa of Biological Siences*, 5(1), 105–111.