
DESAIN PRIMER SECARA *IN SILICO* UNTUK AMPLIFIKASI GEN *tcdA* BAKTERI *CLOSTRIDIUM DEFFILCILE*

I Gusti Agung Ayu Satwikha Dewi¹, Amellya Octifani²

¹Prodi DIV Teknologi Laboratorium Medis,
Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Bali
Internasional

²Fakultas Ilmu Kesehatan, Prodi D3 Teknologi
Laboratorium Medis, Universitas Anwar Medika

Email: ayusatwikha@iikmpbali.ac.id

ABSTRACT

Antibiotics are drugs used to fight infections caused by bacteria. C. difficile bacteria is a bacterium that causes Clostridium difficile infection (ICD). Toxin A of C. difficile bacteria is exotoxin A (tcdA) which is a virulence factor that causes disease. Toxin A can damage the intestinal mucosa and cause bleeding. The cost of examining and treating patients with AAD and PMC is very high, so the dosage must be determined correctly. Laboratory tests function to determine the presence or absence of an ICD. The discovery of specific biomarkers is a discovery priority to improve the quality of laboratory tests. Specific primary design is an important step in all types of laboratory examination methods, one of which is molecular examination by PCR. The primary design must have specific properties so as to be efficient at target amplification. This study aims to obtain a primer design that can be used to limit the amplification area of the TcdA gene in silico. This study used a literature study from the NCBI genbank to obtain the tcdA gene sequence of C. defficile bacteria with accession number DQ902560.1. The tcdA gene sequence of C. difficile bacteria was analyzed using Primer3Plus to determine whether there is hairpin and dimer formation. Furthermore, identification was carried out using web-based in silico PCR to determine the number of amplicon and visualization on the electrophoretic gel. The level of tcdA gene homology in the species group in the BLAST test. The results showed that the best primer design for in silico detection of the tcdA gene of C. difficile was the forward primer 5'-GCAGATGCCAAGAGACACAC-3' and the reverse primer 3'-GCAGATGCCAAGACACACAC-5'. The primary design is able to amplify the tcdA gene region with a size of 247 amplicons.

Keywords: *tcdA; in silico; primer; Clostridium difficile*

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan obat yang bermanfaat bagi manusia yang mana obat ini digunakan untuk melawan infeksi akibat bakteri (Debie Rizqoh et al., 2016). Obat ini bekerja dengan cara membunuh bakteri atau mempersulit bakteri untuk berkembang biak dalam tubuh manusia (Purba & Manurung, 2017). Ibarat pedang bermata dua antibiotik akan bermanfaat bagi tubuh manusia apabila digunakan dengan bijak, akan tetapi jika

antibiotik digunakan secara tidak benar maka justru akan menimbulkan infeksi pada tubuh penggunaannya (Marra et al., 2016). Infeksi *Clostridium difficile* (selanjutnya ditulis ICD) merupakan infeksi akibat kesalahan menggunakan antibiotik. Peristiwa ICD di rumah sakit sudah menjadi ancaman global karena angka kejadiannya semakin meningkat selama beberapa dekade terakhir (Liwang & Sinto, 2021). Kasus ICD di

Jawa Tengah cukup tinggi beberapa faktor risiko yang mempengaruhi yaitu lama perawatan, pemakaian antibiotik dan lama penggunaan antibiotik (San Millán et al., 2013).

Bakteri *C. difficile* merupakan bakteri penyebab ICD tersebut. *C. difficile* merupakan bakteri basil gram positif yang bersifat anaerob, berbentuk spora serta dapat menghasilkan toksin. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri *C. difficile* adalah eksotoksin A (*tcdA*) dan/atau toksin B (*tcdB*) yang berperan sebagai faktor virulensi penyebab penyakit. Toksin A bersifat enterotoksin yang dapat merusak mukosa usus dan merangsang pengeluaran cairan, sementara toksin B bersifat sitotoksin yang dapat merusak sel-sel kolon (Riley et al., 2013) Lebih parahnya dapat menyebabkan erosi pada mukosa usus dan merangsang pengeluaran cairan dari usus, selain itu toksin ini juga dapat menyebabkan perdarahan (Putri, 2015).

Biaya pemeriksaan dan pengobatan pada seorang penderita *associated antibiotic diarrhea* (AAD) maupun (*Pseudo Membrane Colitis*) PMC sangat tinggi, sehingga perlu memperhatikan lamanya pemakaian antibiotika dan besarnya dosis yang diberikan kepada penderita penyakit infeksi dengan tepat (Kumala, 2004). Sehingga diagnosis yang tepat menjadi kunci dalam pengobatan yang tepat untuk ICD.

Uji laboratorium telah dikembangkan seperti uji mikrobiologi, uji serologi dan uji molekuler untuk mendeteksi bakteri *C. difficile*. Uji kultur jaringan dianggap sebagai standar emas pemeriksaan *C. difficile*., namun memiliki keterbatasan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pemeriksaan dan rentan terjadi kontaminasi (Lagier et al., 2015) . Uji serologi menjadi salah satu metode yang kerap digunakan di laboratorium dalam deteksi *C. difficile* (Carroll et al., 2020), namun belum mampu deteksi cepat toksin TcdA yang dikeluarkan oleh bakteri *C. difficile* (Lall et al., 2017). Uji

PCR menjadi salah satu tes amplifikasi asam nukleat yang mampu mendeteksi gen toksin TcdA dari bakteri *C. difficile*. Pemeriksaan ini memiliki tingkat kepekaan yang tinggi (McDonald et al., 2018).

Penemuan biomarker menjadi prioritas utama peneliti selama satu dekade terakhir ini. Biomarker membantu peningkatan metode pemeriksaan yang lebih spesifik ke target (Purba & Manurung, 2016). Deteksi bakteri bakteri *C. difficile* dapat ditemukan dengan pengembangan deteksi terhadap toksin A (TcdA) (Huang et al., 2015). Desain primer menjadi langkah penting dalam semua jenis metode PCR untuk memastikan amplifikasi spesifik dan efisien dari urutan target (Kalendar et al., 2011). Primer spesifik dibuat dari sekuen DNA yang telah diketahui urutannya. Primer spesifik dapat dirancang untuk mengamplifikasi gen tertentu, yang memberikan peluang lebih besar untuk mendapatkan hasil PCR yang baik sesuai target (Ethica et al., 2019). Sekuen primer yang spesifik akan mampu memberikan efek besar pada spesifisitas dan sensitivitas reaksi (Ethica et al., 2019) (Ye et al., 2012).

Tujuan penelitian ini yaitu memperoleh desain primer yang dapat digunakan untuk membatasi daerah amplifikasi terhadap gen TcdA yang didesain secara *in silico*. Sehingga dengan primer yang didesain tersebut, dapat digunakan dalam proses amplifikasi menggunakan PCR.

METODE PENELITIAN

Studi literatur digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai faktor virulensi dari bakteri *C. difficile* terutama toksin spesifik yang dihasilkannya. Toksin spesifik tersebut dicari urutan gennya dari *genebank* NCBI (Pusat Informasi Bioteknologi Nasional) dengan nomor akses DQ902560.1 (*tcdA*) (Gambar 1). Urutan gen *tcdA* ini yang digunakan sebagai dasar primer beserta model 3-D-nya (Gambar 2).

```
>DQ902560.1 Clostridium difficile strain ATCC 43594 TcdE (tcdE) gene,
complete cds; and TcdA (tcdA) gene, partial cds
TTTACAGATGAATATATTGCAGCAACTGGTTCAGTTATTATTGATGGTGAGGAGTATTATTTTGATCCTG
ATACAGCTCAATTAGTGATTAGTGAATAGATAAAAAATATGTTAAATATATCCTCTTATACTTAAATATAT
AAAAATAAACAAAATGATACACTACATAAAGTGTCTATCTAATATGAAGATTTACCAATAAAAAGGTGG
ACTATGATGAATGCACAGTAGTTCACCTTTTTATATTTCTAATGGTAACAAAATATTTTTTATATAAAC
CTAGGAGGCGTTATGAATATGACAATATCTTTTTTATCAGAGCATATATTTATAAAGTTAGTAATTTTTAA
CTATATCATTTTGATACATTATTAGGATGTTAAGTGCAATAAAAAGTCGTAAATTTAATTCTAGTTTTGG
AATAGATGGAGGAATCAGAAAAGTAGCAATGATAGCATGTATATTTTTTTTTATCAGTAGTTGACATTCTT
ACAAAGTTTAACTTTTTATTTATGTTACCACAAGATTGTCAATTTTTTAAGACTAAAACATCTTGGA
TATCTGAATTTTTCTCTATTTTATTTATTTATATGAAAAGTGTAAGTATATTAATAAATATGTGCTTATG
TGGATTACCAGTACCTAAGAGATTAAAGGAAAAAATAGCAATTTTACTAGATGCAATGACAGATGAAATG
AATGCTAAGGATGAAAAGTAAGTAATGGTAGATATAATAAAGATATTAACAAATAAAAAGTGTTATCCAA
ATAAGAATAGCTGAAAGTTATCATAATTCATGAACTAATAATGAAAACGAGGGAGCAGATGCCAAGAGA
CACACAAGTATTAATACATATAATTTTGAAGCAAGTGTTCATTACTATATAGATGACAAGGTAGTATAT
CAAACATTGGTTTCAAAAGATGGTGCATGGTCAGTTGGTAAAATCTATTAAGCTACATTAGTTACAGATA
TCACAAACTATAATAGTTAAACATAGAAATATGTGCAAAATTTGTGATGGAAATTTATTCAAAAACACAAAA
TACGTGATGAAGGACAAAATGATATAGAAAATAAGTATCAAACCTTAATAAATGATTTAATTGATAGTTT
AAAAGTTATAGGAAAAATATATAAAGAAATAAAAACATTAATAAATAAAGATATGTTTACAAATTTACT
ATCAGACAATCTCCTTATCTAATAGAAGAGTCAATTAACCTAATTGAGTATCTTTAAATTTGAAATTTAGG
AAGTGATTTAAATATGAAAACCTAAATTTATAAAAAATCAATATTAATTTATTTTTAAAAAATAGAAAGGA
GTGTATAAGATTTATTTTCAAAGTTTAAAAACAAGAAAATCAATTTAAATTTTCAAGGAATAAATGTGG
TTATAGAAGTGGATTTATTATCAAATAATAATACTAGGAGGTTTTTTATG
```

Gambar 1. Urutan gen tcdA (Accesion number DQ902560.1)



Gambar 2. Struktur 3-D protein TcdA Clostridium difficile yang divisualisasikan dengan RCBS PDB

Selanjutnya, dilakukan perancangan primer menggunakan Primer3Plus dari sekuen gen target (Ethica et al., 2019). Rancangan primer kemudian diidentifikasi dan dipilih untuk menghindari pembentukan *hairpin* dan *dimer* (Ethica et al., 2017). Primer yang baru yang telah diidentifikasi, digunakan sebagai input untuk PCR *in silico* berbasis web ([http:// insilico.ehu.es/](http://insilico.ehu.es/) PCR/) menggunakan semua genom *Clostridium* yang diambil dari sumber *database*nya

(Bikandi et al., 2004).

Terakhir dilakukan analisis sekuens dengan mengklik pita DNA yang muncul sebagai produk PCR keluaran program atau menggunakan alat 'Amplify Show Result'. Langkah ini bertujuan untuk memperjelas apakah produk PCR *in silico* (amplikon) spesifik untuk genom *C. difficile* dan benar-benar merupakan bagian dari gen yang ditargetkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen tcdA merupakan penyusun protein TcdA yang berfungsi sebagai eksotoxin yang akan menyebabkan kematian kolonosit, hilangnya fungsi barrier intestinal, dan kolitis neutrofilik (Putri, 2015). Urutan gen pada gambar 1 digunakan sebagai dasar desain primer. Struktur 3D protein TcdA ditampilkan sebagai uji validitas jika sekuens DNA genom yang digunakan untuk merancang primer (tcdA) menghasilkan

protein terlipat (fungsional). Gambar 2 menunjukkan bahwa protein TcdA terlipat, dan karenanya berfungsi. Hal ini membuka kemungkinan untuk menggunakan protein TcdA sebagai penanda protein bakteri atau untuk mengembangkan vaksin maupun reagen dengan menggunakan protein tersebut sebagai target.

Hasil rancangan desain primer menggunakan Primer3Plus diperoleh sebagai hasil input urutan gen tcdA (Gambar 1 dan 2) yang tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil rancangan desain primer menggunakan Primer3Plus

Primer pair No.	Primer sequence	Panjang primer	Tm (°C)	Ukuran produk (bp)	GC content	Amplifocation Size (bp)
1.	5'-CACAAAGATGGTGCATGGTC-3'	20	60,0	150	50,0%	150
	3'-TCATTTTGCCTTCATCACG	20	57,1	150	40,0%	
2.	5'-TCACAAAGATGGTGCATGGT-3'	20	60,0	151	45,0%	151
	3'-TCATTTTGCCTTCATCACG-5'	20	57,1	151	40,0%	
3.	5'-AGCAGATGCCAAGAGACACA-3'	20	59,6	248	50,0%	248
	3'-TCATTTTGCCTTCATCACG-5'	20	57,1	248	40,0%	
4.	5'-TTCACAAAGATGGTGCATGG-3'	20	60,0	152	45,0%	152
	3'-TCATTTTGCCTTCATCACG-5'	20	57,1	152	40,0%	
5.	5'-GCAGATGCCAAGAGACACAC-3'	20	59,4	247	55,0%	247
	3'-GCAGATGCCAAGAGACACAC-5'	20	57,1	247	40,0%	

Urutan primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR dapat memberikan pengaruh besar pada spesifisitas dan sensitivitas reaksi. Penggunaan Primer3Plus membantu dalam memperoleh data seperti urutan primer, panjang primer, titik leleh, ukuran produk, persentase GC *conten* serta ampikon. Data pada tabel 1 memudahkan dalam memilih desain primer yang tepat dengan kualitas yang baik.

Urutan gen yang diinput ke Primer3Plus memperoleh 5 *pair* urutan primer dengan karakteristik yang berbeda-beda. Temperatur titik leleh/ *melting point* antara 57,1 – 60,0 °C.

Menurut Biassoni, *et al.* (2020), panjang primer yang ideal yaitu 18-24 nukleotida. Tabel 1 menunjukkan panjang pasang primer 1-5 yaitu sebanyak 20 buah, sehingga pair 1-5 memiliki panjang primer yang ideal. **Ukuran produk** primer yang diperoleh

memiliki rentang antara 150-248 bp. Menurut (Riley et al., 2013) ukuran produk yang ideal antara 80-300 basis, sehingga ukuran produk primer memenuhi syarat ideal.

Persentase GC *conten* memberikan informasi mengenai kekuatan annealing. Menurut (Raso & Alessandro, 2014), kandungan primer harus memiliki kandungan GC sekitar 50%. Tabel 1 menunjukkan persentase GC *conten* antara 40-50%, sehingga pasang primer 1-5 masuk dalam rentang yang direkomendasikan.

Urutan primer komplementer perlu diperhatikan, bahwa desain primer tidak boleh mengandung homologi intra-primer lebih dari 3 pasang basa. Jika primer memiliki wilayah homologi sendiri karena dapat menyebabkan "snap back". Bahaya yang terkait lainnya adalah homologi yang terjadi antar-primer: Homologi parsial di

wilayah tengah dua primer yang dapat mengganggu hibridisasi atau annealing dan memicu pembentukan dimer primer (Ethica et al., 2019). Table 1 menunjukkan bahwa hanya pasang primer 5 yang tidak memiliki homologi intra-primer, sedangkan yang lainnya punya. Sehingga hanya pasang primer 5 yang direkomendasikan untuk desain primer gen tcdA bakteri *C. difficile*.

Pasang primer yang sudah memenuhi kualifikasi diinput ke *in silico* PCR pada [http:// insilico.ehu.es/ PCR/](http://insilico.ehu.es/PCR/). PCR *in silico*

disebut juga e-PCR atau PCR virtual yang berfungsi memberikan gambaran awal tentang sifat primer, cara primer berikatan, lokasi pengikatan primer dan produk yang akan dihasilkannya. Dengan melakukan hal tersebut efisiensi dan sensitivitas primer hasil desain dapat diprediksi.

Pasang primer 5 selanjutnya dimasukkan ke dalam PCR *in silico* untuk mengemplifikasi fragmen gen tcdA dari *C. difficile*.

***In silico* PCR amplification**

Gambar 3. Input desain primer pair 5 ke dalam PCR *in silico*, untuk mengamplifikasi fragmen gen tcdA dari Clostridium difficile (Ethica dkk., 2018).

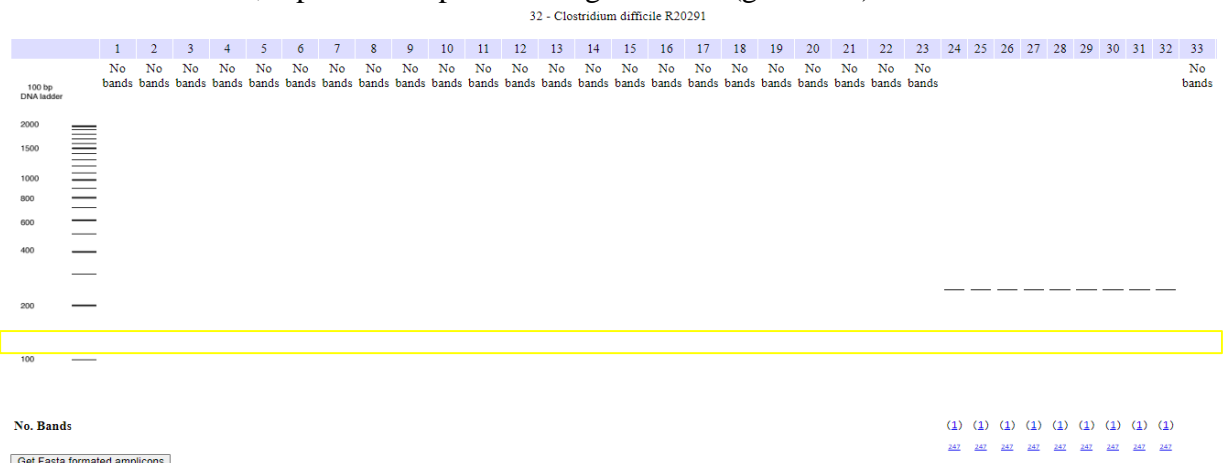
Tabel 2 menunjukkan semua strain *Clostridium* saat ini yang tersimpan dalam *dated* program PCR *in silico* (dengan memilih menu APPLY TO ALL *Clostridium* pada template genomik PCR *in silico*).

Tabel 2 Daftar genom spesies *Clostridium* yang digunakan sebagai template PCR *in silico*

Daftar lengkap strain <i>Clostridium difficile</i> dalam <i>Dated</i> <i>in silico</i> PCR	
1 - Clostridium acetobutylicum ATCC824	30 - Clostridium difficile M12031 - Clostridium difficile M68
2 - Clostridium acetobutylicum DSM 1731	32 - Clostridium difficile R20291
3 - Clostridium acetobutylicum EA 2018	33 - Clostridium kluveri DSM 555
4 - Clostridium acidurici 9a	34 - Clostridium kluveri NBRC 12016
5 - Clostridium autoethanogenum DSM 10061	35 - Clostridium lentocellum DSM 5427
6 - Clostridium beijerinckii NCIMB 8052	36 - Clostridium ljungdahlii ATCC 49587
7 - Clostridium botulinum A str. ATCC 19397	37 - Clostridium novyi NT
8 - Clostridium botulinum A str. ATCC 3502	
9 - Clostridium botulinum A str. Hall	

- | | |
|---|---|
| 10 - Clostridium botulinum A2 str. Kyoto | 38 - Clostridium pasteurianum BC139 - Clostridium perfringens |
| 11 - Clostridium botulinum A3 str. Loch Maree | 40 - Clostridium perfringens ATCC 13124 |
| 12 - Clostridium botulinum B str. Eklund 17B | 41 - Clostridium perfringens SM101 |
| 13 - Clostridium botulinum B1 str. Okra | 42 - Clostridium phage phiSM101 |
| 14 - Clostridium botulinum BKT015925 | 43 - Clostridium phytofermentans ISDg |
| 15 - Clostridium botulinum Ba4 str. 657 | 44 - Clostridium saccharobutylicum DSM 13864 |
| 16 - Clostridium botulinum E3 str. Alaska E43 | 45 - Clostridium saccharolyticum WM1 |
| 17 - Clostridium botulinum F str. 230613 | 46 - Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4(HMT) |
| 18 - Clostridium botulinum F str. Langeland | 47 - Clostridium sp. BNL1100 |
| 19 - Clostridium botulinum H04402 065 | 48 - Clostridium sp. SY8519 |
| 20 - Clostridium cellulolyticum H10 | 49 - Clostridium stercorarium subsp. stercorarium DSM 8532 |
| 21 - Clostridium cellulovorans 743B | 50 - Clostridium stercorarium subsp. stercorarium DSM 8532 |
| 22 - Clostridium cf. saccharolyticum K10 | 51 - Clostridium sticklandii DSM 519 |
| 23 - Clostridium clariflavum DSM 19732 | 52 - Clostridium tetani 12124569 |
| 24 - Clostridium difficile 2007855 | 53 - Clostridium tetani E88 |
| 25 - Clostridium difficile 630 | 54 - Clostridium thermocellum ATCC 27405 |
| 26 - Clostridium difficile BI1 | 55 - Clostridium thermocellum DSM 1313 |
| 27 - Clostridium difficile BI9 | |
| 28 - Clostridium difficile CD196 | |
| 29 - Clostridium difficile CF5 | |

Hasil sekuens gen pasang primer 5 dimasukkan dalam *in silico* PCR pada <http://insilico.ehu.es/PCR/>, diperoleh amplikon sebagai berikut (gambar 4).



Gambar 4. Reprerentasi Grafis Amplikon hasil input PCR *in silico* dari gen tcdA *C. difficile*

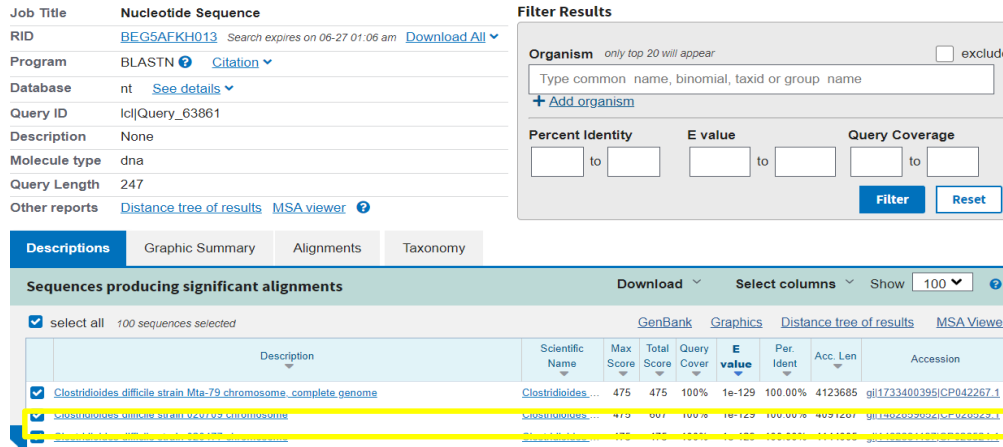
Jumlah amplikon yang muncul dari hasil input PCR *in silico* berbasis web sebanyak 9 buah. Program PCR *in silico* berbasis web menunjukkan panjang dan mobilitas elektroforesis amplikon. Dari jumlah amplikon dan posisi amplikon menunjukkan lokasi amplikon yang sejajar. Lokasi yang

sejajar ini membantu dalam pemilihan pasangan primer yang diinginkan dan meminimalkan kemungkinan produk yang tidak ditargetkan. Ini tidak hanya meningkatkan spesifisitas tetapi juga meminimalkan waktu yang dibutuhkan terutama ketika melakukan verifikasi kerja

secara in vitro. Oleh karena itu, primer dan probe yang dihitung dari gen yang dipilih akan berfungsi sebagai tanda tangan untuk identifikasi bakteri.

Meskipun tidak semua galur bakteri *C. difficile* dapat diuji menggunakan *dated*

[http:// insilico.ehu.es](http://insilico.ehu.es) saat ini, uji BLAST menunjukkan bahwa di antara galur *C. difficile* lainnya, gen *tdcA* sangat terkonservasi, hal ini ditunjukkan dengan tingkat homologi 100% pada kelompok spesies (gambar 5).



Gambar 5. Hasil tingkat homologi amplicon menggunakan BLASTN

Setelah melakukan PCR *in silico*, dilakukan pengecekan produk amplicon yang akan muncul pada elektroforesis gel. Menggunakan PCR *in silico* diperoleh gambar virtual hasil amplicon pada gel elektroforesis yang ditunjukkan pada Gambar 4 dengan posisi amplicon sejajar.

Hasil dari penelitian ini didasarkan pada studi *in silico* atau prediksi menggunakan PCR *in silico* pada [http:// insilico.ehu.es/](http://insilico.ehu.es/) PCR. Hasil rancangan desain primer *in silico* ini dapat digunakan untuk mendukung keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan PCR *in vivo* sebagai cara untuk mendeteksi dini dan mengidentifikasi agen penyebab infeksi oportunistik yang disebabkan oleh bakteri *C. difficile*.

SIMPULAN

Desain primer yang diperoleh secara *in silico* menghasilkan primer terbaik untuk deteksi gen *tdcA* bakteri *C. difficile* yaitu primer *forward* 5'-GCAGATGCCAAGAGACACAC-3' dan primer *reverse* 3'-GCAGAT

GCCAAGAGACACAC-5'. Desain primer tersebut mampu mengamplifikasi daerah gen *tdcA* dengan ukuran 247 amplicon.

DAFTAR PUSTAKA

- Bikandi, J., Millán, R. S., Rementeria, A., & Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 20(5), 798–799. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491>
- Debie Rizqoh, Nita RatnaSari, Rina Nurlia Wati, Fery Santosa, & Rianita Hasanah. (2016). Aktivitas Bakteri Filosfer Daun Reundeu (*Staurogyne longata*) Sebagai Penghasil Senyawa Antimikrob Potensial. *Jurnal Analis Laboratorium Medik*, 1(1), 1–7.
- 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>

DOI: <https://doi.org/10.51544/jalm.v8i1.3806>

- Huang, J. H., Shen, Z. Q., Lien, S. P., Hsiao, K. N., Leng, C. H., Chen, C. C., Siu, L. K., Chong, P. C. S., & Vedantam, G. (2015). Biochemical and immunological characterization of truncated fragments of the receptor-binding domains of *C. difficile* Toxin A. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135045>
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, *98*(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>
- Kumala, W. (2004). Clostridium Difficile: Penyebab Diare dan Kolitis Pseudomembranosa, Akibat Konsumsi Antibiotika yang Irasional. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, *23*(1), 34–38.
- Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>
- Lall, S., Nataraj, G., & Mehta, P. (2017). Use of culture- and ELISA-based toxin assay for detecting Clostridium difficile, a neglected pathogen: A single-center study from a tertiary care setting. *Journal of Laboratory Physicians*, *9*(04), 254–259. https://doi.org/10.4103/jlp.jlp_157_16
- Liwang, F., & Sinto, R. (2021). Pendekatan Klinis Terkini Infeksi Clostridium difficile Nosokomial. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, *8*(2), 104. <https://doi.org/10.7454/jpdi.v8i2.307>
- Marra, F., George, D., Chong, M., Sutherland, S., & Patrick, D. M. (2016). Antibiotic prescribing by dentists has increased Why? *Journal of the American Dental Association*, *147*(5), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.12.014>
- McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, *66*(7), e1–e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
- Purba, D., & Manurung, D. B. S. (2016). Perbandingan Pemeriksaan Basil Tahan Asam Metodedirect Smear Dan Metode Imunochromatographi Test Pada Tersangka Penderita Tuberkulosis Paru Di Upt. Kesehatan Paru Masyarakat Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Utara. *Jurnal Analisis Laboratorium Medik*, *1*(1), 32–37.
- Purba, D., & Manurung, D. B. S. (2017). Perbandingan Pemeriksaan Basil Tahan Asam Metodedirect Smear Dan Metode Imunochromatographi Test Pada Tersangka Penderita Tuberkulosis Paru Di Upt. Kesehatan Paru Masyarakat Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Utara. *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing (ICASSP) 2017*, *41*(2), 84–93.
- Putri, D. I. (2015). Infeksi Clostridium Difficile Pada Diare yang Diinduksi Penggunaan Antibiotika Clostridium Difficile Infection On Antibiotic Associated Diarrhea. *Majority*, *4*(7), 39–44.
- Raso, R., & Alessandro, B. (2014). *Quantitative Real-Time PCR - Methods and Protocols / Springer*.
- Riley, M. C., Aubrey, W., Young, M., & Clare, A. (2013). PD5: A general purpose library for primer design software. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080156>
- San Millán, R. M., Martínez-Ballesteros, I., Rementeria, A., Garaizar, J., & Bikandi, J. (2013). Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes*, *6*(1), 2–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-513>
- 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*, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>