

OPTIMASI SUHU DESAIN PRIMER GEN CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*) RESISTENSI BAKTERI *Clostridium botulinum*

Veny Karlina, Rafika Sari, Pratiwi Apridamayanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura,

Jalan Prof. Dr. Hadari Nawawi, Pontianak, 78124

Email: venykarlina.mpw@gmail.com

ABSTRAK

Clostridium botulinum, bakteri penghasil neurotoksin yang dapat menyebabkan kondisi lumpuh yang berpotensi fatal pada manusia. *Clostridium botulinum* memiliki kerentanan resistensi menengah terhadap kloramfenikol. Penyebab resistensi terhadap kloramfenikol diperantarai oleh plasmid yang mengandung gen *Chloramphenicol Acetyltransferase* (CAT). Tujuan penelitian ini yaitu mengoptimasi suhu untuk mendapatkan primer dengan kriteria yang terbaik dari gen CAT bakteri *Clostridium botulinum* serta mengetahui susunan nukleotida dari hasil perancangan primer sekuen nukleotida gen CAT bakteri *Clostridium botulinum*. Optimasi suhu dilakukan dengan pengaturan suhu yang dilakukan pada rentang 52°C, 55°C, 58°C, 57°C, 60°C, dan 63°C melalui program Primer3Plus. Hasil optimasi suhu terbaik yang didapat adalah pada suhu 60°C yang memperlihatkan 1 kandidat primer dengan kriteria primer terbaik. Ukuran panjang basa yang dimiliki 22 dengan urutan primer *forward* GCATGACTCTCTACAGCCATCA dan primer *reverse* TTGATCCTCAGCTATTGTAGGG dengan ukuran 22 panjang basa. Primer yang didapat menunjukkan bahwa kandidat primer yang didapat bisa digunakan sebagai primer untuk mendeteksi resistensi antibiotik kloramfenikol dengan menggunakan PCR.

Keyword: Optimasi suhu, desain primer, gen CAT, *Clostridium botulinum*.

PENDAHULUAN

Antibiotik adalah zat kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh mikroorganisme. Antibiotik digunakan dalam pengobatan penyakit infeksi pada manusia.⁽¹⁾ Salah satu antibiotik yang sering digunakan adalah kloramfenikol. Kloramfenikol digunakan sebagai antibiotik yang bersifat bakteriostatik dan mempunyai spektrum luas. Kloramfenikol efektif untuk pengobatan infeksi berat yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif.⁽²⁾ Penyebab resistensi terhadap kloramfenikol diperantarai oleh plasmid yang mengandung gen Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT). Gen CAT adalah gen yang mengkode sintesis enzim Acetyltransferase yang dapat mengubah kloramfenikol dengan mengkatalisis pembentukan 3-asetil kloramfenikol sehingga kloramfenikol menjadi inaktif.⁽³⁾

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mazuet 2016, Salah satu bakteri yang memiliki kerentanan resistensi menengah terhadap kloramfenikol adalah *Clostridium botulinum*.⁽⁴⁾ (8) Pada manusia, jenis botulisme yang disebabkan oleh *Clostridium botulinum* yang paling sering dilaporkan adalah *wound botulisme*, *infant botulisme* dan *foodborne botulism*.^(2,5,6) Terdapat 112 kasus botulisme yang di laporkan di Inggris dalam rentang tahun 2000 sampai tahun 2005.^(7,8,9) Kloramfenikol merupakan antibiotik yang dapat digunakan untuk pengobatan botulisme.⁽¹⁰⁾ *Clostridium botulinum* mengandung gen CAT sehingga memiliki kecenderungan untuk resistensi terhadap kloramfenikol.⁽¹¹⁾

Penelitian bioinformatika (insiliko) berbasis web digunakan untuk analisis sekuen yang dijalankan secara online melalui program yang tersedia secara gratis di web. Salah satu analisis secara insiliko yang dapat dilakukan adalah mencari primer dari gen resistensi suatu antibiotik. Desain primer secara insiliko akan memudahkan dalam memperoleh primer terbaik untuk proses amplifikasi fragmen gen.^(7,8) Perancangan suatu primer dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu metode yaitu program Primer3Plus. Primer3Plus ini dapat memberikan kandidat-kandidat dari urutan nukleotida suatu gen sehingga diperoleh suatu primer yang dapat digunakan untuk PCR.⁽¹⁰⁾ Program primer3plus juga dapat digunakan untuk mengoptimasi suhu agar didapatkan primer terbaik.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Laptop ACER, situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mencari data sekuens nukleotida gen sampel, program Primer3plus pada situs (<http://www.primer3plus.com>) sebagai program perancangan kandidat primer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data berbasis sekuens nukleotida dari sampel gen *cat Clostridium botulinum* yang didapat dari NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Jalannya Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pencarian data sekuens nukleotida gen CAT dari bakteri *Clostridium botulinum* menggunakan penelusuran pada menu khusus di NCBI yakni (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>) dengan kata kunci yaitu “*Clostridium botulinum*, CAT”. Data sekuens nukleotida yang telah didapatkan, kemudian dilakukan optimasi suhu dengan mengganti suhu di setiap pick primer yang di lakukan menggunakan program Primer3Plus. Hasil optimasi suhu berupa kandidat primer. Kandidat primer yang didapat di lanjutkan analisis secara deskriptif untuk menentukan satu primer terbaik dari hasil optimasi suhu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pencarian Sekuen Nukleotida Gen CAT *Clostridium botulinum* menggunakan situs NCBI

Sekuen nukleotida gen CAT dapat diperoleh dengan menggunakan software bioinformatik berupa NCBI. Pencarian sekuen nukleotida gen CAT dimulai dengan membuka website NCBI “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>” dan mengganti “*all database*” dengan pilihan “*gene*”. Keyword yang dimasukkan pada kolom *search* adalah “*Clostridium botulinum*, CAT”. Keyword yang digunakan bertujuan agar mendapatkan sekuen nukleotida yang spesifik dan saling berkaitan antara bakteri *Clostridium botulinum* dengan gen CAT. Hasil pencarian melalui NCBI diidentifikasi terlebih dahulu pada bagian *summary*. Rincian informasi singkat atau *summary* dari hasil pencarian NCBI dapat dilihat pada Gambar 1.

cat chloramphenicol acetyltransferase [*Clostridium botulinum* A str. ATCC 3502]
 Gene ID: 5187860, updated on 25-Mar-2016

Summary

Gene symbol	cat
Gene description	chloramphenicol acetyltransferase
Locus tag	CBO0619
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Clostridium botulinum A str. ATCC 3502 (strain: ATCC 3502)
Lineage	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium

Gambar 1. Rincian Informasi Singkat dari Gen CAT *Clostridium botulinum*

Sekuen nukleotida dari gen CAT *Clostridium botulinum* dapat diakses pada bagian “*Genomic regions, transcripts, and products*” berupa menu *GenBank* ataupun menu *FASTA*. Hasil pencarian sekuen nukleotida melalui data *GenBank* NCBI didapatkan gen CAT *Clostridium botulinum* memiliki 627 panjang basa nukleotida dengan urutan basa yang tertera pada Gambar 2. Data *origin* yang didapatkan dari menu *FASTA* akan digunakan untuk mencari primer dari gen CAT *Clostridium botulinum*.

```

ATGAAGTATATTGATTTTAAATGATTTTGAAAGAAAAGAACATTATAAGTTTTTGAAAGTGTCGATAATC
CACAATTTAATATATGTATGAATATTGATGTAACAAATTTTTTGAGATTTGTAAAAAGCAATAAGATATC
ATTTTACTATAGTATGATCTATGCTTCTACACATGTAATGAATGAAATAAAAGATTTTCGTTATAAAATT
AGAGATGGAAAAATTATTCTGCATGACTCTCTACAGCCATCATTTACAGATATGGAATCTAATAAAATT
TATTTAAAATTGTTACCTTACCTCTTAAAAAGGATATTATAGAATTTTCAAATCTGCAAAAAGAGGTTTC
AAAAAATCAAAAAGAGTATTTCCCTACAATAGCTGAGGATCAAGATAAATTAATATACTTTTCTGTATA
CCCTGGATATCCTTTACTAGTATTTGGAATGAAATTGTAATGAATAAAGAAGATTCTATACCTAGAATCT
CCTTTGGCAAATATTTTAAACAAGATAATAAAGTTTTGCTACCATATTCTGTACAAGTAAACCACATGCT
ATTAGATGGTATTCATGTTGGTAAGTATATTGAAAAATTACAAAACCTTTATTGATAAATTTCAATAA
  
```

Gambar 2 Basa Nukleotida Gen CAT *Clostridium botulinum*

Perancangan Kandidat Primer dengan menggunakan Primer3Plus

Perancangan kandidat primer dilakukan melalui website Primer3Plus <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> dengan memasukkan urutan sekuen nukleotida pada bagian “main”. Proses penempelan primer ditentukan oleh nilai *melting temperature* yang tepat, sehingga dapat menempel pada sampel DNA yang akan diamplifikasi pada proses *annealing*.⁽¹²⁾ Oleh karena itu, Dilakukan optimasi suhu untuk mendapatkan primer dengan T_m yang optimum pada bagian “General Setting, Primer T_m ”. Suhu pertama yang digunakan adalah suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C. Untuk suhu kedua, digunakan suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C.

Tabel 1. Hasil Pencarian Kandidat Primer dengan Primer3Plus pada suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C.

Kandidat	Primer Forward	Primer Reverse	Panjang Produk
Primer 1	TCTGCATGACTCTCTAC AGC	CCTCAGCTATTGTAGGGA AA	161 bp
Primer 2	TGACTCTCTACAGCCAT CATT	CCTCAGCTATTGTAGGGA AA	155 bp
Primer 3	TCTGCATGACTCTCTAC AGC	TCCAGGGTATACAGGAA AAG	200 bp

Tabel 2. Hasil Pencarian Kandidat Primer dengan Primer3Plus pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C.

Kandidat	Primer Forward	Primer Reverse	Panjang Produk
Primer 1	GCATGACTCTCTACAGC CATCA	TTGATCCTCAGCTATTGT AGGG	163 bp
Primer 2	GCATGACTCTCTACAGC CATCA	AAGGATATCCAGGGTAT ACAGGAA	204 bp
Primer 3	GCATGACTCTCTACAGC CATCA	GATCCTCAGCTATTGTAG GGAAA	161 bp

Hasil perancangan primer menggunakan situs Primer3Plus mendapatkan 6 pasang primer dengan dua kali *pick primer* karena dua jenis penggunaan suhu yang berbeda. Primer yang didapat, terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*. Primer forward merupakan primer yang berada di ujung depan DNA target dengan fungsi untuk menandai ujung depan untai DNA yang akan digandakan, sedangkan primer reverse merupakan primer yang berada di ujung belakang DNA target dengan fungsi menandai ujung belakang untai DNA yang akan digandakan.⁽¹³⁾ Kandidat primer dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Panjang Basa

Berdasarkan analisis kriteria primer gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C, kandidat primer 1 sampai dengan kandidat primer 3 baik *forward* maupun *reverse*, telah

memenuhi kriteria panjang basa yang baik karena masuk ke dalam rentang panjang basa 18-30 nukleotida yang merupakan syarat dari kriteria primer. Sedangkan primer gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C, dari kandidat primer 1 sampai dengan kandidat primer 3 baik *forward* maupun *reverse*, juga memenuhi kriteria primer karena masuk ke dalam rentang panjang basa 18-30 nukleotida sehingga semua kandidat primer ini dapat digunakan sebagai primer untuk dilakukan proses PCR. Hasil analisis kriteria primer dapat dilihat pada tabel 3 dan tabel 4.

Tabel 3. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C.

No	Primer	Panjang Basa
1	Forward	20
	Reverse	20
2	Forward	21
	Reverse	20
3	Forward	20
	Reverse	20

Tabel 4. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C.

No	Primer	Panjang Basa
1	Forward	22
	Reverse	22
2	Forward	22
	Reverse	23
3	Forward	22
	Reverse	24

Ujung Primer

Primer yang baik, adalah primer yang memiliki ujung G atau ujung C. ujung G dan C dimaksudkan agar hasil polimerisasi yang didapat spesifik. Sekuen nukleotida G dan C memiliki ikatan hydrogen yang lebih besar dibandingkan dengan ujung T dan ujung A. ikatan hydrogen yang dimiliki sekuen nukleotida G dan C sebesar 3 ikatan hydrogen. Kandidat primer dari suhu optimum 55°C, kandidat pertama memiliki ujung forward T dan C serta ujung reverse C dan A. kandidat kedua ujung forwardnya T dan T serta ujung reverse nya C dan A. Kandidat kedua ujung forwardnya T dan C serta ujung reversenya T dan G. Kandidat primer dari suhu optimum 60°C, kandidat pertama memiliki ujung forward G dan A serta ujung reversenya T dan G. Kandidat kedua ujung forwardnya G dan A serta ujung reversenya A dan A. Kandidat ketiga ujung forwardnya G dan A serta ujung reverse nya G dan A. Sehingga kandidat primer yang masih tergolong baik adalah kandidat primer ke 1 dan 3 pada suhu optimum 55°C dan kandidat primer ke 1 dan 3 pada suhu optimum 60°C.

Persentase G dan C (% GC)

Tabel 5. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C.

No	Primer	% GC (%)
1	Forward	50
	Reverse	45
2	Forward	42,9
	Reverse	45
3	Forward	50
	Reverse	45

Tabel 6. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C.

No	Primer	% GC (%)
1	Forward	50
	Reverse	45,5
2	Forward	50
	Reverse	47,8
3	Forward	50
	Reverse	41,7

Kriteria primer yang diikuti oleh sebagian besar program desain primer adalah menggunakan persen basa G (guanin) dan C (sitosin) dengan rentang antara 40% hingga 60%.⁽¹⁴⁾ Jika suatu primer memiliki nilai % GC dibawah 40%, maka dapat menurunkan efisiensi pada proses PCR karena primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada template. Hasil analisis persen GC dapat dilihat pada tabel 5 dan 6. Hasil analisis %GC berdasarkan tabel 5, menunjukkan dari kandidat primer 1 sampai 1 semuanya memasuki rentang kriteria %GC. Untuk data pada tabel 6, hasil analisis yang diperoleh dari kandidat primer 1 sampai dengan kandidat primer 3 semuanya memenuhi kriteria %GC yang baik, sehingga semua kandidat primer ini dapat berikatan secara spesifik dalam proses PCR.

Repeats dan Run

Repeats merupakan pengulangan sekuen nukleotida yang cukup panjang dengan urutan basa sama (lebih dari tiga basa berurutan sama, misal basa AGCGGGGGATG memiliki 5 basa berurutan G) harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya *breathing* pada primer dan mispriming, sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Primer sebaiknya juga tidak memiliki *run* yang merupakan urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat di toleransi, misalnya ATATATAT. Hal ini juga menyebabkan terbentuknya struktur *hairpin*. Suhu optimum 55°C menunjukkan kandidat primer ke 3 terdapat urutan basan yang berulang sebanyak 4 kali pada bagian reverse nya. Hal ini menunjukkan bahwa kandidat primer ke 3 tidak dapat digunakan sebagai primer dalam proses PCR. Suhu optimum 60°C menunjukkan

dari kandidat primer ke 1 hingga kandidat primer ke 3, kriteria *repeat* dan *run* nya masih dapat ditoleransi atau masih memenuhi kriteria primer yang baik.

Kriteria Primer Terbaik dari Gen CAT *Clostridium botulinum*

Hasil analisis yang hampir memenuhi semua syarat kriteria primer terbaik terletak pada kandidat primer ke 1 dan 3 pada suhu 50°C, 53°C, dan 58°C serta kandidat primer ke 1 dan 3 pada suhu optimasi 57°C, 60°C dan 63°C. Namun jika di analisis berdasarkan kriteria melting temperature (Tm), hanya beberapa kandidat primer yang memasuki rentang melting temperature. *Melting Temperature* yang optimal untuk primer adalah 52°-58°C dimana hasil yang didapatkan akan lebih baik dibandingkan dengan primer yang memiliki nilai *melting temperature* lebih rendah.⁽¹⁵⁾ Nilai Tm sangat berhubungan dengan optimasi suhu. Suhu yang didapatkan akan digunakan pada proses *annealing* dan rumus yang dapat digunakan untuk penentuan suhu *annealing* adalah $T_m - 5$. Hasil analisis kriteria primer dapat dilihat pada tabel 7 dan 8.

Tabel 7. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 52°C, suhu optimum 55°C dan suhu maksimum 58°C.

No	Primer	Tm (°C)
1	Forward	53,9
	Reverse	51,4
2	Forward	53,1
	Reverse	51,4
3	Forward	53,9
	Reverse	51,1

Tabel 8. Hasil Analisis Kriteria Primer Gen CAT *Clostridium botulinum* pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C.

No	Primer	Tm (°C)
1	Forward	56,5
	Reverse	53,8
2	Forward	56,5
	Reverse	54,6
3	Forward	56,5
	Reverse	54,6

Kandidat primer yang memasuki kriteria melting temperature adalah kandidat primer ke 1, 2, dan 3 pada bagian forward (tabel 7) dan kandidat primer ke 1, 2, 3 pada bagian forward dan reverse (tabel 8). Oleh karena itu, primer yang dapat dipilih sebagai primer dengan kriteria terbaik adalah kandidat primer ke 1 dan 3 pada suhu optimasi optimum 60°C. Kandidat primer yang dipilih sebagai primer terbaik adalah kandidat primer ke 1 pada suhu optimasi optimum 60°C karena berdasarkan hasil analisis, kandidat primer ke satu memasuki semua kriteria primer terbaik yaitu panjang basa 22 pada primer forward dan 22 pada primer reverse. Kriteria kedua adalah ujung primer yang dua dua ujung nya tidak mengandung ujung A atau T melainkan hanya salah satu ujung. Kriteria ketiga adalah %GC, dimana nilai yang didapat memasuki rentang % GC yang baik yaitu

50% pada primer forward dan 45,5% pada primer reverse. Kriteria keempat adalah repeats dan runs, dengan nilai reapeats 3 buah dan runs 3 buah yang artinya masih memasuki batas toleransi. Kriteria terakhir adalah melting temperature yang merupakan kriteria terpenting yang akan mempengaruhi proses annealing dalam PCR. Nilai yang dimiliki oleh kandidat primer pertama adalah 56,5 pada bagian forward dan 53,8 pada primer reverse.

Tabel 9. Primer dengan Kriteria Primer yang Terbaik dari Gen CAT

Primer	Panjang Basa	Tm (°C)	% GC (%)	Sekuen nukleotida
Forward	22	56,5	50	GCATGACTCTCTACAGCCATCA
Reverse	22	53,8	45,5	TTGATCCTCAGCTATTGTAGGG

KESIMPULAN

1. Hasil perancangan primer *forward* dan *reverse* sekuen nukleotida gen CAT bakteri *Clostridium botulinum* terdapat satu prime terbaik, yaitu kandidat primer ke 1 pada suhu optimasi 57, 60, dan 63°C
2. Susunan nukleotida yang dimiliki oleh primer kandidat primer ke 1 sebagai kandidat primer terbaik adalah GCATGACTCTCTACAGCCATCA pada bagian primer forward dan TTGATCCTCAGCTATTGTAGGG pada bagian primer reverse. Dengan panjang produk yang akan dihasilkan sebanyak 163 bp.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dian R. Uji Resistensi Bakteri *Escherichia Coli* Yang di Isolasi dari Plak Gigi Terhadap Merkuri Dan Antibiotik Kloramfenikol, Jurnal E-Biomedik. 2015; 3(1): 59-63
2. Siswandono, Soekardjo B. Kimia Medisinal. Edisi kedua. Surabaya: Airlangga University Press; 1995.
3. Jamilah. Evaluasi Keberadaan Gen Catp Terhadap Resistensi Kloramfenikol Pada Penderita Demam Tifoid. Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan Dan Lingkungan. 2015: 146-152.
4. Mazuet C, Et All. A Penicillin And Metronidazole Resistant *Clostridium Botulinum* Strain Responsible For An Infant Botulism Case. Clinical Microbiology And Infection. 2016; 22: 644.E7e644.E12.

5. Rahman V, Dewi A, Dina F. Pola Resistensi *Acinetobacter Baumannii* Yang Diisolasi Di Intensive Care Unit (Icu) Rsud Arifin Achmad Provinsi Riau Periode 1 Januari Hingga 31 Desember 2014. Jom FK. 2015; (2)2: 1-8.
6. AMRIN - Study Group. Penggunaan Antibiotik Di RS Dr Soetomo Surabaya Dan RSUP Dr. Kariadi Semarang. 2005.
7. Sebahia M, Et All. Genome Sequence Of A Proteolytic (Group I) Clostridium Botulinum Strain Hall A And Comparative Analysis Of The Clostridial Genome. Cold Spring Harbor Laboratory Press.2007; 17: 1082–1092: 2007.
8. Lindstrom M, Et All. Multiplex Pcr Assay For Detection And Identification Of Clostridium Botulinum Types A, B, E, And F In Food And Fecal Material. Applied And Environmental Microbiology. 2001: 67(12).
9. Natalia L, Priadi A. Botulismus: Patogenesis, Diagnosis Dan Pencegahan. Wartazoa. 2012; 22(3).
10. Muliawan SY. Bakteri Anaerob yang Erat Kaitannya dengan Problem di Klinik Diagnosis. Jakarta: EGC; 2008.
11. UniProtKB - B1IFL1 (B1IFL1_CLOBK). *Clostridium botulinum*; 2008 tersedia dari: <https://www.uniprot.org/uniprot/B1IFL1>[20 okteber 2018 13.30].
12. Wu L C, Jorng T H, His Y H, Feng M L, Hsien D H, and Meng F T. Primer Design for Multiplex PCR Using a Genetic Algorithm. Soft Comput: 2007; 11. 855-863
13. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., and Dveksler, G.S., 1993, General Concepts for PCR Primer Design, Gen. Res., 3 : 30-37
14. Kurniawan N, dkk. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V. Universitas Islam Bandung; Fakultas Teknologi Industri: 2014
15. Borah P. Primer Designing For PCR. Science Vision. 2011; 11(3): 134-136