

DESAIN PRIMER SECARA IN SILICO UNTUK AMPLIFIKASI GEN phtD BAKTERI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Fransisca Probo Setyoningrum^{1,2*}, Irwan Budiono¹, Ari Yuniastuti³, Ratna Sri Rahayu¹

1. Prodi Kesehatan Masyarakat, Universitas Negeri Semarang
2. Prodi Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Pelita Harapan
3. Prodi Biologi, Universitas Negeri Semarang

E-mail Korespondensi: fransisca.setyoningrum@uph.edu

ABSTRAK

Latar Belakang: Pneumonia masih menjadi penyakit infeksi yang banyak di derita oleh kelompok rentan yakni anak – anak dibawah lima tahun dan lansia. Pneumonia disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Angka mortalitas dan morbiditas dari infeksi pneumonia sangat tinggi. *S.pneumoniae* memiliki gen phtD yang berperan dalam adhesi sel host sehingga sering dikaitkan dengan virulensi bakteri, kemampuannya dalam membangkitkan imunitas menjadikan phtD ini menjadi kandidat vaksin karena memiliki sifat imunogenik. Penemuan biomarker spesifik merupakan prioritas untuk meningkatkan kualitas pelayanan di laboratorium untuk mencegah dan mempercepat penanganan. Rancangan primer yang spesifik dibutuhkan pada pemeriksaan molekuler metode PCR.

Metode: Penelitian ini menggunakan studi literatur dari genebank NCBI untuk mendapatkan sekuens gen phtD bakteri *S.pneumoniae* dengan nomor akses KP127708.1. Urutan gen dianalisis dengan menggunakan Primer BLAST, selanjutnya diidentifikasi masing – masing primer yang didapatkan sesuai dengan kriteria primer yang baik.

Hasil: Dari 10 kandidat primer yang di dapatkan. Dilakukan analisa seperti kandungan GC content, panjang primer, ada tidaknya hairpin dan dimer. Hasil analisa dengan keiteria tersebut merujuk pada pasang primer nomor 2. Kemudian dilakukan uji spesifisitas pada spesies *S.pneumoniae*, tingkat homologi gen pada kelompok spesies pada uji BLAST juga menunjukkan 100% hanya menempel pada spesies tersebut.

Simpulan: primer *foward* 5'TGGCAGGCAAGTACACAACA3' dan primer *reverse* 3'GCCTCCGCATCTGCTATCTT5'

Kata Kunci: *Streptococcus pneumoniae*, biomarker, PCR, *In silico*

ABSTRACT

Background: Pneumonia remains an infectious disease that is commonly suffered by vulnerable groups, namely children under five years of age and the elderly. Pneumonia is

caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae*. The mortality and morbidity rates of pneumonia infection are very high. *S. pneumoniae* has a *phtD* gene that plays a role in host cell adhesion, so it is often associated with bacterial virulence. Its ability to trigger immunity makes *phtD* a candidate for a vaccine because of its immunogenic properties. The development of specific biomarkers is a priority to improve the quality of laboratory services to prevent and accelerate treatment. Specific primer designs are needed for PCR molecular testing.

Methods: This study used a literature review from the NCBI gene bank to obtain the *phtD* gene sequence of *S. pneumoniae* bacteria with access number KP127708.1. The gene sequence was analyzed using Primer BLAST, and then each primer obtained was identified according to the criteria for a good primer.

Results: From the 10 candidate primers obtained, analyses were conducted on GC content, primer length, and the presence or absence of hairpins and dimers. The results of the analysis with these criteria referred to primer pair number 2. Then, a specificity test was carried out on the *S. pneumoniae* species, and the gene homology level in the species group in the BLAST test also showed 100% attachment to that species.

Conclusion: forward primer F5 'TGGCAGGCAAGTACACAACA3' and reverse primer R3 'GCCTCCGCATCTGCTATCTT5'.

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, biomarker, PCR, *In silico*

PENDAHULUAN

Radang paru – paru atau pneumonia merupakan penyakit infeksi akibat bakteri *Streptococcus pneumoniae* (Ali et al, 2021). Infeksi ini biasa menyerang pada kelompok rentan seperti anak – anak dengan usia di bawah 5 tahun dan usia lanjut di atas 70 tahun yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Manoharan et al,2018). Berdasarkan laporan Global Burden of Disease tahun 2021 terdapat 2,1 juta kematian akibat pneumonia. Menurut WHO, pneumonia menyebabkan kematian lebih dari 808.000 anak di bawah 5 tahun dan menyumbang 15% dari semua kejadian kematian pada anak – anak. UNICEF juga melaporkan bahwa di tahun 2024 terdapat lebih dari 1.400 kasus pneumonia per 100.000 anak setiap tahun atau 1 kasus per 71 anak (Unicef Data, 2024).

Pneumonia menular terutama melalui droplet atau percikan pernapasan yang dihasilkan ketika penderita batuk, bersin, atau berbicara. Droplet yang mengandung mikroorganisme penyebab pneumonia ini dapat terhirup oleh orang-orang di sekitar penderita, terutama dalam jarak dekat. Selain itu, penularan juga dapat terjadi melalui kontak langsung dengan penderita atau menyentuh permukaan benda yang terkontaminasi, kemudian tanpa sadar menyentuh area wajah seperti mulut, hidung, atau mata. Cara penularan lain yang perlu diperhatikan adalah melalui aspirasi, dimana bakteri dari rongga mulut atau tenggorokan terhirup masuk ke dalam paru-paru. Kondisi ini lebih berisiko terjadi pada orang dengan gangguan menelan atau kesadaran menurun. Meskipun lebih jarang, penularan juga dapat terjadi secara hematogen yaitu melalui aliran darah dari infeksi di bagian tubuh lain yang menyebar ke paru-paru (Ramirez et, 2017)

Beberapa faktor meningkatkan risiko penularan dan berkembangnya pneumonia, termasuk sistem kekebalan tubuh yang lemah, adanya penyakit kronis seperti diabetes atau PPOK, usia ekstrem baik pada bayi maupun lansia, kebiasaan merokok, konsumsi alkohol berlebihan, serta tinggal di lingkungan padat dengan ventilasi udara yang buruk. Pemahaman

tentang cara penularan ini penting untuk upaya pencegahan dan pengendalian penyebaran pneumonia di masyarakat (Prina et al, 2015).

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri yang memiliki morfologi berbentuk coccus, dengan susunan berpasangan dalam rantai pendek, memiliki struktur dinding sel peptidoglikan (Gram Positif), berkapsul, melakukan hemolisa parsial, tidak memiliki flagel dan dapat tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob (Sadowy dan Hryniewicz, 2020). *Streptococcus pneumoniae* ini juga memiliki sifat – sifat biokimia antara lain seperti sensitif terhadap optochin, larut dalam empedu, mampu memfermentasi glukosa, tidak memiliki enzim katalase. Kemudian mengandung gen virulensi seperti gen ply atau pneumolysin yang memiliki kemampuan untuk merusak jaringan, gen lytA atau autolisin yang mampu menyebabkan autolisis sel saat fase stasioner dan gen phtD yang memiliki peran dalam berinteraksi dengan sel inang. Gen phtD tingkat virulensi yang cukup tinggi sehingga banyak studi yang memanfaatkan gen phtD ini sebagai vaksin karena bersifat imunogenik (Li et al, 2022).

Pemeriksaan laboratorium dikembangkan untuk mendeteksi adanya infeksi bakteri *Streptococcus pneumoniae*, pemeriksaan tersebut antara lain adalah uji mikrobiologi, uji serologi dan uji molekuler. Uji kultur dianggap *gold standart* dalam pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* dan uji ini memiliki keterbatasan yakni lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pemeriksaan sehingga rentan terjadi kontaminasi (Setyoningrum, 2023). Uji serologi juga digunakan sebagai uji konfirmasi dengan memanfaatkan reaksi imun terhadap infeksi seperti kadar CRP, RF dan ASTO. Uji Molekuler metode PCR menjadi salah satu tes amplifikasi asam nukleat yang mampu mendeteksi gen phtD dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* sejak bakteri ini masuk untuk menginfeksi. Pemeriksaan metode PCR ini dinilai memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi (Lee at all, 2018).

Penemuan biomarker masih menjadi trend yang menarik untuk diteliti hingga hari ini untuk percepatan diagnosa sehingga penderita lebih cepat untuk ditangani dan tidak menderita dalam waktu yang lama (Setyoningrum, 2024). Deteksi *Streptococcus pneumoniae* dengan dapat menemukan adanya gen phtD. Desain primer menjadi hal yang penting dan sangat menentukan dalam metode PCR. Primer spesifik dibuat dari sekuen DNA yang telah di *sequencing*. Primer dapat dirancang untuk mengaplifikasi gen tertentu, yang memberikan peluang lebih besar untuk memberikan efek yang lebih besar untuk mendapatkan hasil PCR yang baik sesuai dengan target.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh rancangan desain primer yang optimal sehingga dapat digunakan untuk memberi batasan daerah yang akan di amplifikasi terhadap gen phtD yang di desain secara *in silico*. Sehingga dengan primer yang di desain dapat digunakan dalam proses amplifikasi menggunakan PCR, yang nantinya dapat digunakan sebagai biomarker deteksi cepat infeksi *Streptococcus pneumoniae*.

METODE

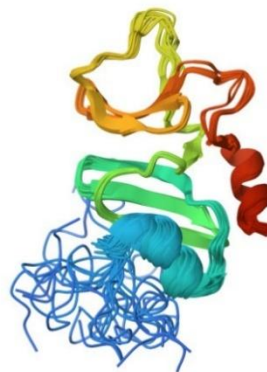
Penelitian diawali dengan melakukan studi literatur digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai faktor pathogen dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* terutama protein yang digunakan untuk yang dihasilkan. Protein imunogenik spesifik tersebut dicari urutan gennya dari genebank NCBI URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dengan nomor akses KP127708.1 histidine triad protein D (phtD) (Gambar 1). Urutan gen ini digunakan sebagai dasar primer beserta model 3Dnya (Gambar 2).

```

>KP127708.1 Streptococcus pneumoniae strain 96-047 histidine triad protein D
(phtD) gene, complete cds
ATGAAAATCAATAAAAAATATGTAGCAGGTTTCAGTGGCAGTTCTTGCCCTAAGTGTGTTGTTCCCTATGAGCTTGGACG
TTACCAAGCTGGTCAGGTTAAGAAAGAGTCTAATCGAGTTGCTTATATAGATGGTGTATCAGGCTGGTCAAAGGCAG
AAATTTGACACCAGATGAAGTCAGTAAGAGAGAGGGGATCAACGCCGGAACAAATTTGTTATCAAGATTACGGATCAAT
TATGTGACCTCTCATGGAGACCATTATCATTACTATAATGGCAAGGTTCCCTATGATGCCATCATCAGTGAAGAACT
TCTCATGAAGATCCGAATTATCAGTTGAAGGATTGACACATTGTCAATGAAATCAAGGGTGGCTATGTGATTAAGGT
AGACGGAAATACTATGTTTACCTTAAGGATCGAGCTCATGCGGATAATGTCCGTACAAAAGAAGAAATCAATCGTCA
AAACAAAGAACATAGTCAGCATCGTGAAGGAGGACTTCAGCAACGATGGTGGCGTAGCCCTTTGCACGTTCCAGGA
CGCTAACAGATGATGGGTATATCTTCAATGCATCTGATATCATTGAGGACACGGGTGATGCTTATATCGTTCCTCAC
GGCACCATTACCATTACATTCCCTAAGATGAGTTATCAGCTAGCAGGTTAGCTGCTGCAGAAAGCCTATTTGGAATGGG
AAGCAGGGATCTCGTCTTCTCAAGTCTAGTTATAATGCAAAATACAGCTCAACCAAGATTGTGAGAGAACACAAT
CTGACTGTCACTCCAATTTATCATCAAAATCAAGGGGAAAAACATTTCAAGCCTTTTACGTGAATTGTATGCTAACCC
TTATCAGAGCATGTGAATCTGATGGCCCTTATTTTCGACCCAGCGCAAAATCACAAAGTCGAACCCGACAGGGTGTAGC
TGTCCCTCATGGTAAACCATTACCACTTTATCCCTTATGAACAAATGTCTGAATTGGAAAAACGAATTGCTCGTATTA
TTCCCTTTCGTTATCGTTCAAACCATTTGGGTACCAGATTCAAGACCAGAACAACCAAGTCCACAATCGACTCCGGAA
CCTAGTCCAAAGTGTGCAACCTGCACCAATCCTCAACCAGCTCCAAGCAATCCAAATGATGAGAATTTGGTCAAAGA
AGCTGTTGCAAAAGTAGGCGATGGTTATGTCTTTGAGGAGAATGGAGTTTCTCGTTATATCCCAGCCAGGATCTTT
CAGCAGAAACAGCAGCGGCATTGATAGCAAACCTGGCCAAAGCAGGAAAGTTTATCTCATAAGCTAGGAGCTAAGAAAA
CTGACCTCTCTAGTGTGAGAAATTTACAATRAAGGCTTATGACTTACTAGCAAGAATTCACCAAGATTTACTTGATA
ATAAAGGTGACAAAGTTGATTTTGGGCTTTGGATAACCTGTTGGAACTCAAGGATGTCTCAAGTGATAAAGTC
AAGTTAGTGGATGATATTTGCTTCTTGTAGCTCCGATTCGTCATCCAGAACGTTTAGGAAAACCAATGCGCAAAAT
TACCTACACTGATGATGAGATTCAGTAGCCAGTTGGCAGGCAAGTACACAACAGAAGACGGTTATATCTTTGATC
CTCGTGATATAACCAGTGATGAGGGGATGCCTATGTAATCCACATATGACCCATAGCCACTGGATTAAAAAAGATA
GTTTGTCTGAAGCTGAGAGAGGCCAGCCAGGCTTATGCTAAAGAGAAAGGTTTGACCCCTCCTTCGACAGACCATCA
GGATTCCAGAAACTACTGAGGCAAAAGGAGCAGAAGCTATCTACAACCCGCTGAAAGCAGCTAAGAAGGTGCCACTTG
ATCGTATGCCTTACAATCTTCAATATACTGTAGAAGTCAAAAACGGTAGTTAATCATACCTCATTATGACCATTAC
CATAACATCAAATTTGAGTGGTTGACGAAGGCCTTTATGAGGCACCTAAGGGGTACTCTTTGAGGATCTTTTGGC
GACTGTCAAGTACTATGTGCAACATCCAAACGAACGCTCCGCATTGAGATAATGGTTTTGGTAACGCTAGCGACCATG
TTCGTAATAAATAAGGCAGACCAAGATAGAACCTGATGAAGATAAGGGACATGATGAAGTAAGTGAAGCAACTCACCC
AAGAGACAGAGGAAGAAGCTGAAGATACTACAGATGAGGCTGAAATTCCTCAAGTAGAGCATTCTGTTATTAACGCT
AAGATAGCAGATGCGGAGGCCTTGCTAGAAAAGTAACAGATCCTAGTATTAGACAAAATGCTATGGAGACATTGAC
TGGTCTAAAAAGTAGTCTTCTTCGGAACGAAGATAATAACACTATTTTCAGCAGAAGTAGATAGTCTCTTGGCTTT
GTTAAAAAAGTCAACCGGCTCCGATACAGTAG

```

Gambar 1. Urutan gen phtD (Accession number KP127708.1)



Gambar 2. Struktur Protein phtD *Streptococcus pneumoniae* yang divisualkan dengan RCSB PDB

Langkah selanjutnya dilakukan analisis spesifisitas primer, hal ini harus mempertimbangkan primer yang dapat menempel dan mengenali gen target. Analisis primer dapat menggunakan BLAST dari NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> *software* ini digunakan untuk mendapatkan sekuens kandidat primer. Sekuens kandidat primer akan dibandingkan dengan sekumpulan database sekuens dari berbagai organisme di NCBI. Kesamaan antara primer dan gen dari organisme tertentu akan ditunjukkan dalam identitas persentase. Semakin tinggi nilai persentase ini, semakin banyak primer spesifik gen. Jika ada primer yang dapat mengenali gen selain gen phtD dengan spesifisitas yang tinggi maka primer tersebut tidak akan dipilih.

Analisis selanjutnya adalah memastikan bahwa primer tidak dimer, adakalanya primer yang dirancang dapat mengenali urutan dari primer itu sendiri, menempel antar primer *foward* dan primer *reverse*. Hal ini bisa menjadi masalah karena primer akan cenderung saling menempel, tidak dengan gen target dan hal ini dapat mengurangi konsentrasi DNA. Untuk itu perlu dilakukan analisis prediksi dimer dengan menggunakan software yang tersedia untuk memprediksi keberadaan dimer pada kandidat primer, yaitu DINAmelt <http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAmelt>. Hasil analisis menggunakan DINAmelt ini dapat diketahui, berapa banyak pembentukan ikatan G-C, dan keberadaan ujung 3' komplemen.

Analisis yang digunakan selanjutnya adalah analisis struktur sekunder pada amplicon. Struktur sekunder dari amplicon juga harus dianalisis dengan menggunakan Mfold (Zuker, 2003). Analisis ini penting untuk mengetahui apakah ada struktur sekunder di situs pengikatan primer. Adanya struktur sekunder di daerah ini dapat mempengaruhi penempelan primer pada gen target. Hasil analisis ini akan menunjukkan ada atau tidaknya struktur sekunder di situs 5' dan 3', yang juga merupakan situs pengikatan primer. Suhu *annealing* dari masing-masing pasangan primer dan konsentrasi Na⁺ dan Mg²⁺.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen *phtD* merupakan protein imunogenik yang paling berperan penting dalam virulensi dan interaksi dengan sistem imun inang. Gen *phtD* mampu membantu *Streptococcus pneumoniae* dalam menghindari fagositosis sel imun dan dalam adhesi serta kolonisasi pada epitel saluran pernafasan (Narciso et al, 2024). Urutan gen (Gambar 1) digunakan sebagai dasar dalam pembuatan desain primer. Struktur 3D protein *phtD* ditampilkan sebagai validitas bahwa primer yang akan dirancang menghasilkan protein yang fungsional (*folding*) (Gambar 2) menunjukkan bahwa gen *phtD* terdapat bagian yang terlipat menunjukkan bahwa gen berfungsi. Hal ini adalah tanda bahwa protein ini dapat digunakan dalam pengembangan vaksin maupun reagen diagnostik lainnya dengan menjadikan gen *phtD* sebagai target. Hasil rancangan desain primer menggunakan primer BLAST pada NCBI terdapat 10 kandidat primer tercantum dalam Tabel 1. Kandidat primer yang ada diseleksi kembali sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk PCR karena keberhasilan dalam melakukan desain primer dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan. Berdasarkan hal tersebut, maka dipilih satu pasangan primer yang digunakan. Berdasarkan hal tersebut, maka primer terbaik yang yairu pasangan nomor 2. Posisi relatif dari primer gen *phtD* yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Tabel Kandidat Primer Gen *phtD*

	Sequence (5'-3')	Length	TM	GC%	Self complementary	Self 3' complementary
<i>Primer Pair 1</i>						
<i>Foward</i>	AGCAGGGATCTCGTCCTTCT	20	60.03	55	4	2
<i>Reverse</i>	GGATTTGGTGCAGGTTGCAG	20	60.04	55	5	3
<i>Primer Pair 2</i>						
<i>Foward</i>	TGGCAGGCAAGTACACAACA	20	60.11	50	4	0
<i>Reverse</i>	GCCTCCGCATCTGCTATCTT	20	59.97	55	4	0

Primer Pair 3						
<i>Foward</i>	CTGCAACCTGCACCAAATCC	20	60.04	55	5	0
<i>Reverse</i>	ACTTTCCTGCTTGGCCAGTT	20	60.11	50	6	0
Primer Pair 4						
<i>Foward</i>	GCAGTCCTTGCCCTAAGTGT	20	59.96	55	3	1
<i>Reverse</i>	TAATGGTCGCCGTGAGGAAC	20	60.11	55	3	0
Primer Pair 5						
<i>Foward</i>	ACTGGCCAAGCAGGAAAGTT	20	60.11	50	6	3
<i>Reverse</i>	CAGGGTGAGTTGGCTCACTT	20	59.89	55	6	2
Primer Pair 6						
<i>Foward</i>	CAGGTTCACTGGCAGTCCTT	20	59.89	55	3	0
<i>Reverse</i>	CTTGTGATTTGCGCTGGGTC	20	60.11	55	4	1
Primer Pair 7						
<i>Foward</i>	AACCAGCTCCAAGCAATCCA	20	59.89	50	4	0
<i>Reverse</i>	TCTGTCGAAGGAGGGGTCAA	20	60.18	55	4	0
Primer Pair 8						
<i>Foward</i>	CTACAACCGCGTGAAAGCAG	20	59.84	55	4	2
<i>Reverse</i>	AAGGCCTTCGTCAAACCACT	20	59.82	50	8	1
Primer Pair 9						
<i>Foward</i>	GGTGTAGCTGTCCCTCATGG	20	59.82	60	4	3
<i>Reverse</i>	CCGCTCTCTCAGCTTCAGAC	20	60.18	60	4	2
Primer Pair 10						
<i>Foward</i>	AGTTGGCAGGCAAGTACACA	20	59.82	50	5	0
<i>Reverse</i>	TGCTTTCACGCGTTGTAGA	20	60.25	50	4	2

Ukuran *sequence primer* secara umum primer yang ideal memiliki ukuran antara 18 – 30 oligonukleotida. Panjang ini diharapkan cukup untuk mengingat *template* pada suhu *annealing* dan mendapatkan sekuen yang spesifik (Setyoningrum, 2023). Jika primer terlalu pendek maka akan mengurangi spesifitas primer sehingga mudah menempel pada template dengan suhu *annealing* yang tidak seharusnya, sedangkan jika primer terlalu Panjang tidak mempengaruhi spesifisitas secara bermakna. Jumlah basa nukleotida pada primer adalah 20bp. Hasil ini sesuai dengan yang dipersyaratkan.

Persentase GC adalah persentase banyaknya guanin dan sitosin dalam suatu primer memberikan informasi tentang suhu optimal primer dalam proses *annealing*. Kandungan GC sebaiknya berada direntang 40 – 60% (Bustin et al, 2020). Hal ini akan memperkuat perlekatan antara primer dengan DNA template jadi dapat disimpulkan bahwa semakin banyak GC maka akan semakin kuat. Pada Tabel 1 menunjukkan GC content antara 45 % - 55 %, sehingga 9 dari 10 pasang primer yang dihasilkan masuk dalam rentang yang direkomendasikan.

Batas Dimer dan Hairpin pada primer untuk PCR Self complementarity dan 3' complementarity adalah parameter penting yang digunakan untuk menilai kemungkinan terbentuknya struktur sekunder seperti hairpin loops atau dimer primer, yang dapat mengganggu efisiensi amplifikasi. Batas idealnya ≤ 6 untuk *Self complementarity* dan ≤ 3 untuk 3' *complementarity*. Pada tabel 1 terdapat hairpin dan dimer yang terjadi semuanya dalam batas yang masih wajar namun primer terbaik yang memungkinkan digunakan adalah primer pada no 2.

Analisis *in silico* merupakan tahapan yang penting desain primer. Primer juga harus diuji melalui laboratorium. serangkaian Optimasi optimasi kandidat di primer melibatkan optimasi dalam suhu *annealing* (T_a) menggunakan PCR *gradient* dan optimasi konsentrasi primer. Selain primer, optimalisasi reaksi PCR juga dilakukan untuk memeriksa deteksi minimum dan kuantifikasi asam nukleat dalam reaksi, dan hal ini membutuhkan kerja di laboratorium untuk menghasilkan tes PCR yang baik.

PENUTUP

Desain primer diperoleh secara *in silico* menghasilkan primer terbaik untuk deteksi gen phtD pada bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Primer tersebut antara lain adalah primer *forward* F5'TGGCAGGCAAGTACACAACA3' dan primer *reverse* R3'GCCTCCGCATCTGCTATCTT5'. Desain primer tersebut mampu mengamplifikasi daerah gen phtD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Universitas Pelita Harapan program studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik yang telah mendukung para dosen untuk tetap bertumbuh dalam mengembangkan penelitian dan pengembangan biomarker.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M. Q., Kohler, T. P., Schulig, L., Burchhardt, G., & Hammerschmidt, S. (2021). Pneumococcal extracellular serine proteases: Molecular analysis and impact on colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 763152. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.763152>
- Brena de Souza, M., de Carvalho, E., Cergole-Novella, M. C., Molinari, D. A., Colpas, D. R., Carmo, A. M. dos S., Gaiotto Daros, V. dos S. M., & de Campos, I. B. (2023). Multiplex PCR to *Streptococcus pneumoniae* serotype identification directly in cerebrospinal fluid samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(1), 255–266. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04547-3>
- Bustin SA, Mueller R, Nolan T. Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods Mol Biol*. 2020;2065:5-22. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3_2. PMID: 31578684
- Lee AD, Cassidy PK, Pawloski LC, Tatti KM, Martin MD, Briere EC, Tondella ML, Martin SW; Clinical Validation Study Group. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of Bordetella pertussis infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). *PLoS One*. 2018 Apr 13;13(4):e0195979. doi: 10.1371/journal.pone.0195979. PMID: 29652945; PMCID: PMC5898745.

- Li, L., Zhou, J., Li, M., Yu, Z., Gao, K., Yang, J., Cheng, P., Yang, J., Zhang, W., Yu, Z., & Sun, H. (2022). Comparative genomic analysis of *Streptococcus pneumoniae* strains: Penicillin non-susceptible multi-drug-resistant serotype 19A isolates. *Current Microbiology*, 79(49). <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02715-2>
- Manoharan, A., & Jayaraman, R. (2018). Pneumococcal vaccines. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 36(4), 465–474. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_442
- Narciso, A. R., Dookie, R., Nannapaneni, P., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2024). *Streptococcus pneumoniae* epidemiology, pathogenesis and control. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01116-z> [nature.com]
- Prina E, Ranzani OT, Torres A. (2015). "Community-acquired pneumonia." *The Lancet*, 386(9998), 1097-1108.
- Ramirez JA, Wiemken TL, Peyrani P, et al. (2017). "Adults Hospitalized With Pneumonia in the United States: Incidence, Epidemiology, and Mortality." *Clinical Infectious Diseases*, 65(11), 1806-1812
- Setyoningrum, F. P. (2024, December). Examination of Acute Glomerulonephritis After Streptococcus (GNAPS) With Primer of pyrogenic exotoxin B (speB) Gene of Streptococcus pyogenes Bacteria. In *Proceedings of International Conference on Health Science, Practice, and Education* (pp. 566-576).
- Setyonigrum, F. P. (2023, Oktober). Pemeriksaan Preventif Batuk Rejan Primer Gen ptx A, ptx V, ptx E dan ptx C Bakteri Bordetella pertusis. *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan 2023* (pp. 8 -17)
- UNICEF DATA. (2024). Pneumonia in children statistics. Retrieved from <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/>
- World Health Organization. (2019). Pneumonia. Retrieved from <https://www.who.int/health-topics/pneumonia>
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(13):3406-3415. doi:10.1093/nar/gkg595