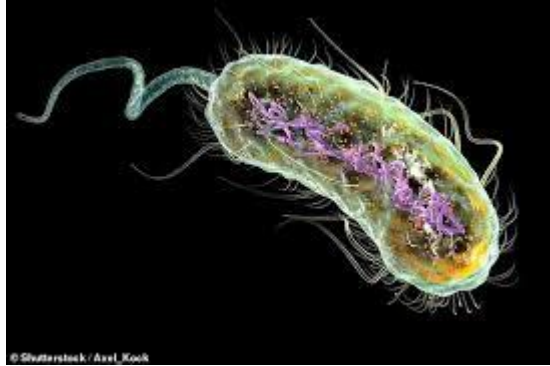


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Escherichia coli*



(National Geographic Indonesia)

Gambar 1 *Escherichia coli*

Bakteri merupakan sekelompok organisme kecil yang umumnya bersel satu dan memiliki peran penting dalam kehidupan sehari-hari (Febriza dkk., 2021). *E. coli* merupakan salah satu jenis bakteri yang termasuk mikroflora normal dan dapat ditemukan di permukaan tubuh baik eksternal maupun internal seperti kulit, saluran pencernaan, saliva, dan konjungtiva (Sender et al., 2016). Bakteri ini banyak terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan merupakan patogen utama yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia (Vila et al., 2016). *E. coli* merupakan jenis bakteri yang sering dipelajari karena dapat menyebabkan infeksi yang parah melalui penularan bakteri baik virulen maupun resisten antara hewan dan manusia maupun dari lingkungan ke manusia melalui berbagai kontak eksternal langsung maupun melalui rantai makanan (Poirel et al., 2018).

1. Klasifikasi *E. coli*

Menurut *National Center for Biotechnology Information* (Schoch *et al.*, 2020), *E. coli* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan : *Bacteria*
Filum : *Pseudomonadota*
Kelas : *Gammaproteobacteria*
Ordo : *Enterobacterales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli* (*E. coli*)

2. Sifat dan karakteristik *E. coli*

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif yang bersifat aerob-fakultatif serta bersifat oksidase negatif yang sering ditemukan pada saluran pencernaan, feses, maupun lingkungan. *Escherichia coli* merupakan golongan mikroorganisme yang perlu diidentifikasi berdasarkan sifat dan karakteristiknya untuk penentuan petogenesis mikroorganisme tersebut. Sifat dan karakteristik mikroorganisme dikendalikan oleh aktivitas enzimatis sel dalam proses metabolisme seluler (Radji, 2018).

a) Morfologi koloni

Escherichia coli merupakan bakteri yang memiliki kemampuan fermentasi laktosa dan dapat memproduksi banyak asam sehingga menghasilkan koloni berwarna hijau metalik pada media EMB (*Eosin Methylene Blue*). *Escherichia coli* memiliki koloni berbentuk bulat dengan permukaan cembung dan halus dengan tepian rata (Khakim dkk., 2018).

b) Morfologi sel

Escherichia coli merupakan bakteri berbentuk batang pendek (kokobasil) yang berukuran 0,4 – 0,7 μm dan memiliki flagel. Bakteri ini dapat tumbuh di hampir semua media peremajaan, memiliki kemampuan meragi laktosa, dan bersifat mikroaerofilik. Bakteri ini memiliki 3 tipe antigen, yaitu antigen O, antigen H, dan antigen K. Antigen yang dimiliki oleh *E. coli* terdiri dari beberapa tipe, yang hingga tahun 2018, telah ditemukan 150 tipe antigen O, 90 tipe antigen H, dan 3 tipe antigen K (Radji, 2018).

3. Faktor virulensi *E. coli*

Faktor virulensi *E. coli* ditentukan oleh antigen permukaan, kandungan enterotoksin, dan hemolisin. Antigen permukaan memengaruhi tipe hospes yang diinfeksi. *Escherichia coli* memiliki dua tipe fimbria yang berpengaruh pada proses pelekatan bakteri pada hospes, yaitu tipe manosa sensitive (pili) dan tipe manosa resisten (*Colonization Factor Antigen*, CFA I dan II). Enterotoksin merupakan racun yang produksinya diatur oleh plasmid pada *E. coli* dan terdiri dari dua tipe, yaitu toksin LT (termolabil) dan toksin ST (termostabil). Toksin LT dapat merangsang enzim adenilat siklase yang dapat meningkatkan permeabilitas sel epitel usus sehingga terjadi akumulasi cairan yang menyebabkan diare, sedangkan toksin ST mengaktifkan enzim guanilat siklase yang menghasilkan guanosin monofosfat siklik, menyebabkan gangguan absorpsi klorida dan natrium yang berakhir pada penurunan motilitas usus halus. Selain membentuk enterotoksin, plasmid pada *E. coli* juga mengatur pembentukan hemolisin, yaitu protein berbahaya yang dapat menyerang sistem sirkulasi (Radji, 2018).

4. Patogenesis *E. coli*

Escherichia coli merupakan mikroorganisme yang memiliki sejumlah isolat patogen yang dapat menyebabkan infeksi usus dan ekstra-intestinal. Beberapa strain *E. coli* tidak berbahaya bagi inangnya dan cenderung bersifat komensalisme (Poirel *et al.*, 2018). Menurut lokasi kolonisasi inang yang disukai, mekanisme virulensi, lokasi kolonisasi inang, dan gejala serta akibat klinis yang ditimbulkan, *E. coli* dapat dikelompokkan menjadi penyebab infeksi intestin dan ekstraintestin. *E. coli* penyebab infeksi intestine terdiri dari *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), *enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) E. coli* (EHEC/STEC), dan *enteroaggregative E. coli* (EAEC) (Gomes *et al.*, 2016). Sedangkan *E. coli* penyebab infeksi ekstraintestin terdiri dari *E. coli* uropatogenik (UPEC) dan *E. coli* meningitis neonates (NMEC) (Radji, 2018).

B. Pemeriksaan Laboratorium *E. coli*

Pemeriksaan laboratorium merupakan tahapan yang sangat penting dalam penegakan diagnosis dan prognosis suatu penyakit untuk menentukan tatalaksana yang tepat (Bakri dkk., 2015). Adapun pemeriksaan laboratorium dalam pemeriksaan *E. coli*, yaitu:

1. Metode konvensional

a) Uji pendugaan

Uji pendugaan dilakukan dengan media *Lactosa Broth* (LB) sebanyak 10 ml yang kemudian ditambahkan dengan suspensi dalam tabung durham kemudian dilakukan inkubasi pada suhu kisaran 28 – 35°C selama 24 jam. Hasil positif

ditandai dengan terbentuknya gas. Tabung yang menunjukkan uji positif diduga bakteri golongan coli (Fhitryani dkk., 2017).

b) Uji penegasan

Uji penegasan dilakukan sebagai lanjutan dari hasil positif pada uji pendugaan. Sampel pada tabung yang memberi hasil positif pada uji pendugaan diambil dengan ose dan dicelupkan pada tabung baru yang berisi dua seri media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB). Tabung seri 1 digunakan sebagai deteksi bakteri *coliform fecal* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, sedangkan tabung seri 2 digunakan untuk melihat bakteri *coliform non-fecal* dan diinkubasi pada suhu 44°C selama 24 jam. Diamati gelembung gas yang terbentuk pada tabung durham di setiap tabung reaksi (Fhitryani dkk., 2017).

c) Uji lengkap

Uji lengkap dilakukan sebagai pemeriksaan lanjutan pada sampel yang memberi hasil positif pada uji penegasan dari masing-masing seri. Sampel dari tabung diambil dengan ose kemudian digoreskan pada media *Mac-Conkey Agar* (MCA). Cawan uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28 – 35°C. Diamati koloni bakteri yang terbentuk dan dicatat karakteristiknya. Koloni yang berbentuk bulat, diameter 2-3 mm dengan warna merah tua diduga positif (+) merupakan *E. coli* (Fhitryani dkk., 2017).

d) Pewarnaan gram

Pewarnaan gram dilakukan sebagai uji mikroskopik. Pemeriksaan ini dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri yang menunjukkan uji positif pada media MCA dan ditotolkan di atas *objek glass*. Tambahkan dengan 1-2 tetes akuades kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan melewati gelas benda

diatas api bunsen secara berulang-ulang hingga terlihat mengering. Diberi zat warna kristal violet dan diamkan selama 1 menit, bilas dengan akuades. Diberi larutan lugol 1 – 2 tetes selama 30 detik. Dibilas dengan aseton alkohol selama 15 detik, lalu dibilas dengan akuades. Diberi 1 tetes larutan safranin (zat warna tanding), diamkan selama 1 menit, bilas dengan akuades dan dikeringkan. Diamati dibawah mikroskop bentuk koloni dan indikasi bakteri gram positif atau negatif dicatat. *E. coli* ditandai dengan koloni berbentuk batang dengan warna merah (Fhitryani dkk., 2017).

e) Uji biokimia

Uji biokimia merupakan metode pemeriksaan untuk mengetahui sifat metabolisme dari koloni bakteri yang sebelumnya telah ditumbuhkan di media pembiakan. Pada metode ini diperiksa kemampuan pada bakteri dalam memfermentasi gula, menghasilkan H_2S , menghasilkan gas, dan memproduksi asam. Pemeriksaan biokimia *E. coli* dilakukan dalam beberapa uji, antara lain:

1) Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) digunakan untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif berbentuk batang. Hasil positif uji TSIA ditunjukkan dengan munculnya warna kuning pada media yang ditusukkan koloni menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan untuk memfermentasi senyawa asam seperti glukosa dan laktosa. Hasil positif TSIA merupakan salah satu sifat bakteri *E. coli* (Khakim dkk., 2018).

2) Uji SIM (Sulfur, Indol, Motilitas)

Koloni bakteri yang tumbuh pada media *Mac-Conkey Agar* (MCA), diinokulasikan dengan cara digores pada permukaan dan ditusuk ke dalam media

agar miring *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Kultur diinkubasi pada suhu 28 - 35°C selama 24 – 48 jam dan diamati. Kemampuan koloni dalam menghasilkan Fe dan gas H₂S ditunjukkan dengan munculnya endapan hitam dan adanya keretakan pada media (Fhitryani dkk., 2017). Pada uji indol didapatkan warna merah pada permukaan media setelah diberikan tetesan reagen kovaks menunjukkan hasil positif, dengan warna transparan pada bagian dasar. Uji motilitas menghasilkan warna putih menunjukkan hasil positif yang merupakan salah satu sifat *E. coli*. Uji motilitas menghasilkan warna putih menunjukkan hasil positif (Khakim dkk., 2018).

3) Uji MR-VP (*Methyl Red-Voges's proskauer*)

Uji MR-VP (*Methyl Red-Voges's proskauer*) didapatkan adanya perubahan warna merah pada media MR setelah pemberian 4 tetesan reagen indikator *methyl red* yang menunjukkan hasil positif. Uji VP tidak terjadi perubahan warna setelah penetesan reagen barrit menunjukkan hasil negatif. Tidak adanya perubahan warna juga terjadi pada uji sitrat *E. coli* menunjukkan hasil negatif. (Khakim dkk., 2018).

4) Uji sitrat

Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasikan koloni bakteri yang tumbuh pada media *Mac-Conkey Agar* (MCA) dengan cara digores pada permukaan agar miring *Simmons Citrate Agar* (SCA). Kultur diinkubasi pada suhu 28 - 35°C selama 24 – 48 jam dan diamati. Koloni *E. coli* ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna dari hijau menjadi biru (Fhitryani dkk., 2017).

2. Metode molekuler

Pemeriksaan bakteri *E. coli* metode molekuler dapat dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pemeriksaan secara molekuler memiliki

keunggulan yaitu memerlukan sampel dalam jumlah sedikit, waktu pemeriksaan lebih singkat dibandingkan metode konvensional, dan memberikan hasil yang lebih spesifik (Rizky dkk., 2021).

C. *Polymerase Chain Reaction*

Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode yang dikembangkan pada sekitar tahun 1980-an oleh Kary Mullis. (Purwakasih dkk., 2021). PCR atau reaksi berantai *polymerase* merupakan metode enzimatik yang bertujuan untuk memperbanyak secara eksponensial (amplifikasi) suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini dapat memperbanyak satu fragmen DNA hingga 20.000 kali dalam 20 siklus reaksi yang berlangsung selama 220 menit (Irianto, 2017).

1. Prinsip metode PCR

Metode PCR memiliki prinsip kerja dengan memanfaatkan kemampuan enzim DNA polimerase dalam melakukan sintesis untai DNA baru yang merupakan komplementer dari DNA template (Purwakasih dkk., 2021). Pada dasarnya PCR merupakan tiruan dari proses replikasi DNA *in vivo*, yang terdiri dari pemisahan untai ganda DNA (*denaturasi*), penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan untai baru DNA (*extension*) yang dilakukan oleh DNA *polymerase* dari arah terminal 5' ke 3', dan hanya dibedakan oleh tidak adanya enzim ligase dan primer RNA pada proses PCR. Selain itu, PCR juga didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer, yaitu komplementer dengan ujung 5' dari dua untai sekuens target. Primer ini berfungsi untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA *polymerase* (Irianto, 2017).

2. Komponen PCR

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, Oligonukleotida primer, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan komponen pendukung lain adalah senyawa buffer.

a) DNA cetakan

Template DNA atau DNA cetakan merupakan hasil ekstraksi DNA yang dilakukan pada sampel baik biologis maupun non biologis. DNA template merupakan cetakan awal dalam proses amplifikasi DNA. Kualitas DNA template harus diperhatikan karena dapat memengaruhi reaksi amplifikasi dan menghambat kerja enzim DNA *polymerase* yang mempersulit proses amplifikasi. Syarat DNA hasil ekstraksi yang baik yaitu konsentrasi dan rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm adalah 1,8- 2,0 (Murtiyaningsih, 2017) Proses isolasi DNA sebagai DNA template dapat berasal dari semua bahan biologis yang berinti sel (Wardana, dkk., 2021).

b) Oligonukleotida primer

Primer merupakan oligonukleotida sintetis yang idealnya terdiri dari 18 – 28 bp dan yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari DNA template. Oligonukleotida memiliki urutan sekuens berbeda dan komplementer dengan sekuens yang berlawanan pada DNA template. Pada satu proses PCR diperlukan satu set primer yang masing-masing terletak di kedua ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* (arah sintesis maju) dan *reverse* (arah sintesis terbalik) yang dikatalisis oleh DNA polimerase. Metode PCR digunakan untuk memperbanyak segmen DNA, yang pada kedua ujungnya telah diketahui urutan basanya (Riupassa, 2023).

c) *Deoksiribonukelotida trifosfat* (dNTP)

Deoksiribonukelotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi (Syarif dkk., 2022).

d) Enzim DNA Polimerase

Enzim DNA polymerase merupakan enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder (Aminah dkk., 2019).

3. Tahapan pemeriksaan dengan metode PCR

Polymerase Chain Reaction pada dasarnya merupakan proses replikasi suatu DNA target yang bertujuan untuk memperbanyak DNA dalam sampel hingga bisa terdeteksi oleh alat. Dalam proses pemeriksaan molekuler dengan metode PCR terdapat beberapa tahapan, yaitu ekstraksi asam nukleat, proses PCR, dan pembacaan dengan alat UV-transluminator.

a) Ekstraksi asam nukleat

Asam nukleat merupakan bagian dari sel yang terdiri atas rangkaian mononukleotida yang dihubungkan dengan ikatan *phospodiester* dan terbagi menjadi *Deoksiribonucleic Acid* (DNA) dan *Ribonucleic Acid* (RNA). Nukletotida tersusun atas gugus fosfat, gula pentosa, dan basa nitrogen yang terbagi dalam kelompok purin (terdiri atas adenin dan guanin) dan pirimidin (terdiri atas sitosin dan timin-urasil). Asam nukelat berfungsi untuk biosintesis protein dan sebagai pembawa sifat keturunan pada organisme (Nurhayati dkk., 2017).

Deoksiribonucleic Acid merupakan asam nukleat dengan empat jenis nukleotida yang tersusun atas masing-masing basa nitrogen, yaitu deoksiadenosin-5-monofosfat (adenin-deoksiribosa-fosfat), deoksiguanosin-5-monofosfat (guanin-deoksiribosa-fosfat), deoksisitidin-5-monofosfat (sitosin-deoksiribosa-fosfat), dan deoksitimidin-5-monofosfat (timin-deoksiribosa-fosfat) (Radji, 2018). Keempat jenis nukleotida ini dihubungkan oleh ikatan fosfodiester pada atom karbon nomor 3 gugus PO_4 pada suatu deoksiribosa dengan atom karbon nomor 5 gugus OH pada deoksiribosa berikutnya (Nurhayati dkk., 2017).

b) Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pada dasarnya PCR terdiri dari pemisahan untai ganda DNA (*denaturasi*), penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan untai baru DNA (*extension*) yang dilakukan oleh DNA *polymerase* dari arah terminal 5' ke 3'. Secara singkat, teknik PCR dilakukan dengan mencampurkan sampel DNA dengan primer oligonukleotida, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim termostabil *Taq* DNA *polymerase* dalam larutan DNA yang sesuai, kemudian mengatur suhu campuran secara berulang pada beberapa puluh siklus hingga mendapat jumlah sekuen yang diinginkan (Irianto, 2017).

1) Pemisahan untai ganda DNA (*denaturasi*)

Denaturasi merupakan proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Proses ini dikenal juga dengan tahap peleburan (*melting*). Tahap ini berlangsung pada suhu tinggi (94 – 96°C) dan merupakan proses pemutusan ikatan hidrogen DNA menjadi untai tunggal (*single strand*). Tahap ini berlangsung selama 1 – 2 menit menghasilkan untai tunggal DNA yang tidak stabil sehingga siap untuk menjadi templat bagi primer (Irianto, 2017).

2) Penempelan primer (*annealing*)

Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer setelah rantai ganda DNA terbuka sehingga menjadi tahap yang sangat penting dalam proses PCR. Pemilihan suhu *annealing* yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sulit terbentuknya ikatan primer dan DNA template. Suhu *annealing* yang digunakan harus disesuaikan dengan T_m atau suhu leleh dari primer dan panjang dari primer. (Amanda dkk., 2019).

3) Pemanjangan untai baru DNA (*extension*)

Pada tahap ini *Taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik (Syarif dkk., 2022).

c) Gel elektroforesis

Gel elektroforesis merupakan teknik yang dapat digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran dengan memanfaatkan medan listrik. Dalam pemeriksaan hasil PCR maupun DNA hasil isolasi, medan listrik akan menggerakkan DNA dari kutub negatif menuju kutub positif. Hal tersebut dapat terjadi karena DNA mengandung gugus fosfat yang bermuatan negatif. Elektroforesis gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal. (Syarif dkk., 2020). Gel agarosa hasil elektroforesis tersebut divisualisasi dengan UV-transluminator dan gambar didokumentasikan (Aminah dkk., 2019).

4. Jenis-jenis metode PCR

a) *Multiplex* PCR

Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) adalah strategi yang divalidasi untuk deteksi cepat dan identifikasi tepat dengan menggabungkan beberapa primer dalam satu tabung reaksi untuk memperkuat fragmen genom dari banyak patogen. Dengan penggunaan panel mPCR, sebuah penelitian menunjukkan peningkatan hasil diagnostik virus pernapasan sebesar 30% hingga 50% dibandingkan dengan antibodi dan kultur fluoresen langsung (Huang *et al.*, 2018).

b) *Nested* PCR

Nested PCR merupakan salah satu metode PCR yang dapat digunakan untuk meningkatkan sensitivitas dan/atau spesifisitas PCR. *Nested* PCR merupakan metode yang melibatkan dua reaksi amplifikasi berurutan dengan pasangan primer yang berbeda pada masing-masing tahapan *Nested* PCR. Amplikon yang dihasilkan dari reaksi tahap pertama digunakan sebagai template untuk PCR kedua, yang diprioritaskan oleh *oligonukleotida* yang ditempatkan di dalam pasangan primer pertama. Penggunaan dua pasang oligonukleotida memungkinkan jumlah siklus yang lebih banyak dilakukan, sehingga meningkatkan sensitivitas PCR. Peningkatan spesifisitas reaksi berasal dari pengikatan dua set primer terpisah ke templat target yang sama. *Nested* PCR adalah metode yang efisien untuk memperkuat segmen template yang panjang tetapi memerlukan pengetahuan tentang urutan target (Green *et al.*, 2019a).

D. Desain Primer

Desain primer adalah proses perancangan potongan sekuen yang komplemen dengan sekuen target dan menjadi langkah awal dalam perolehan sekuen primer

terbaik untuk amplifikasi DNA sehingga dapat digunakan untuk analisis sampel secara *in vitro* menggunakan teknik PCR (Fakih dkk., 2021).

1. Metode perancangan desain primer

Perancangan primer dapat dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan situs yang menerapkan basis ilmu bioinformatika. Studi *in silico* merupakan gabungan dari ilmu biologi dan komputasi yang dibantu dengan komputer serta perangkat lunak yang salah satunya dapat dimanfaatkan untuk merancang sebuah kandidat primer. Dalam proses PCR, primer berfungsi untuk berikatan dengan DNA template yang komplemen dan menentukan daerah yang akan diamplifikasi. Primer juga menjadi tempat penempelan DNA *polymerase* untuk melakukan amplifikasi gen target. Sepasang primer oligonukleotida terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse* akan menempel pada sekuen DNA target dalam proses *annealing* (Fakih dkk., 2021).

2. Syarat-syarat perancangan desain primer

Primer yang baik harus memenuhi beberapa syarat agar mendapatkan hasil amplifikasi terbaik. Syarat ukuran primer yaitu 18-28 bp karena primer yang terlalu panjang dapat mengurangi jumlah ampikon karena membutuhkan waktu yang lama untuk proses pemanjangan dan tidak akan meningkatkan spesifisitasnya melainkan. Syarat selanjutnya yaitu nilai %GC antara 40 – 60%. Persentase G dan C (%GC) adalah persentase jumlah guanin dan sitosin dalam suatu primer. Nilai %GC yang terlalu rendah akan membuat primer tidak dapat menempel secara selektif pada target, sedangkan jika %GC terlalu tinggi dapat menyebabkan hasil yang diperoleh tidak spesifik. Primer yang baik juga harus memerhatikan nilai titik leleh (T_m), yaitu suhu saat 50% untai ganda DNA template terpisah dan primer dapat masuk

untuk proses amplifikasi. Suhu yang optimal untuk T_m dari sebuah primer sebaiknya berada pada rentang 50-65°C. Selain itu, nilai T_m juga sangat berpengaruh pada pemilihan suhu *annealing* pada proses PCR. Nilai T_m yang lebih besar dari 65°C akan mengurangi efektivitas suhu *annealing* sehingga menyebabkan proses amplifikasi DNA berlangsung kurang baik dan nilai T_m yang terlalu rendah akan membuat primer mudah menempel di tempat lain sehingga hasil amplifikasi menjadi tidak spesifik. Hairpin merupakan interaksi intramolekular di dalam primer dan dapat mengganggu proses penempelan primer pada template saat proses PCR. Terbentuknya hairpin harus dihindari karena dapat mengurangi efektivitas dari suatu primer. Nilai hairpin yang dipersyaratkan adalah kurang dari -3 kkal/mol.

Dimer menunjukkan adanya proses hibridisasi antar primer yang terdiri dari *self-dimer* (monodimer) dan heterodimer. *Self-dimer* dapat dianalisis dengan membentuk ikatan antar primer sejenis, seperti *primer forward* ke *primer forward* atau *primer reverse* ke *primer reverse*. Parameter yang dilihat dalam analisis adalah energi bebas atau ΔG . Sementara, analisis heterodimer dilakukan dengan membentuk dua jenis ikatan primer yang berbeda, yaitu *primer forward* ke *primer reverse*. Nilai ΔG pada homodimer maupun heterodimer harus lebih besar dari -6 kkal/mol. Nilai ΔG yang kurang dari -6 kkal/mol akan menyebabkan primer sulit menempel pada sekuen target. Selain dimer, desain primer harus dipilih dengan menghindari adanya sekuen berulang dengan jumlah sekuen berulang maksimal 4 (contoh: TCTCTCTC) dan menghindari sekuen run atau maksimal 3 nukleotida (contoh: TAAAAGC) (Melati dkk., 2022).