

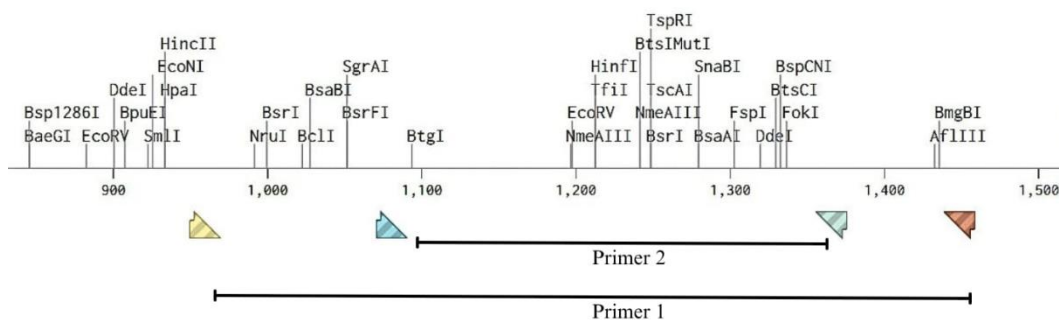
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Desain Primer Spesifik *E. coli*

Desain primer dilakukan secara *in silico* pada situs Primer3plus sehingga didapatkan dua pasang primer, yaitu primer pertama dengan primer *forward* F1 5'TCTCCGTGAAGCTGGTTTCC3' dan primer *reverse* R1 5'GCGACCAATCAGATCCACCA3' yang menghasilkan ukuran produk 509 bp, serta primer kedua dengan primer *forward* F2 5'ATCGGTGAAATACGCAGGCT3' dan primer *reverse* R2 5'TCGTCACCTTGAATGGCAGG3' yang menghasilkan ukuran produk 305 bp. Pengujian karakteristik primer dilakukan secara *in silico* pada situs Primer3plus dan benchling. Kedua pasang primer berada pada region yang sama ditunjukkan pada Gambar 5 di bawah ini.

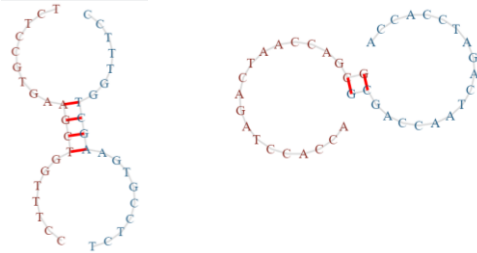
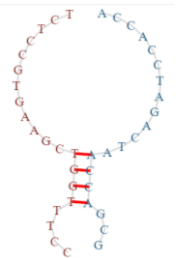


(benchling.com)

Gambar 6 Posisi Primer Pada DNA

Adapun karakteristik primer pertama ditunjukkan pada Tabel 6 di bawah ini.

Tabel 6
Karakteristik Primer Pertama

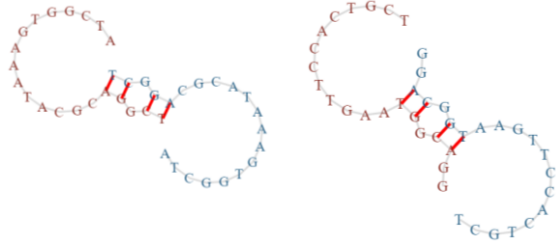
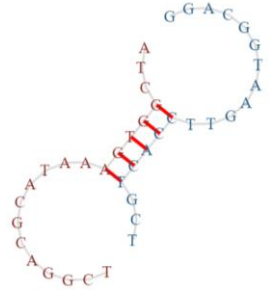
Syarat Primer	Standar	Karakteristik Desain Primer		Kesesuaian
		Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	
Panjang basa	18 – 28 bp	20 bp	20 bp	Sesuai
%GC	40 – 60%	55%	55%	Sesuai
Titik leleh (T _m)	50 – 65°C	60°C	60.1°C	Sesuai
Sekuen berulang	Maksimal 4	2	1	Sesuai
Sekuen run	Maksimal 3	3	2	Sesuai
Nilai hairpin	≥ -3 kkal/mol	0	0	Sesuai
Nilai ΔG homodimer	≥ -6 kkal/mol	-3,97 kkal/mol	-2,35 kkal/mol	Sesuai
				
Nilai ΔG heterodimer	≥ -6 kkal/mol	-3,29 kkal/mol		Sesuai
				

(Primer3plus.com dan benchling.com)

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan bahwa secara keseluruhan pasangan primer pertama memenuhi syarat karakteristik primer.

Adapun karakteristik pasangan primer kedua ditunjukkan pada Tabel 7 di bawah ini.

Tabel 7
Karakteristik Primer Kedua

Syarat Primer	Standar	Karakteristik Desain Primer		Kesesuaian
		Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	
Panjang basa	18 – 28 bp	20 bp	20 bp	Sesuai
%GC	40 – 60%	50%	55%	Sesuai
Titik leleh (Tm)	50 – 65°C	59,8°C	60,3°C	Sesuai
Sekuen berulang	Maksimal 4	1	1	Sesuai
Sekuen run	Maksimal 3	3	2	Sesuai
Nilai hairpin	≥ -3 kkal/mol	0	0	Sesuai
Nilai ΔG homodimer	≥ -6 kkal/mol	-3,45 kkal/mol	-4,43 kkal/mol	Sesuai
Nilai ΔG heterodimer	≥ -6 kkal/mol			Sesuai
				

(Primer3plus.com dan benchling.com)

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan bahwa secara keseluruhan pasangan primer pertama memenuhi syarat karakteristik primer.

Spesifisitas desain primer dilakukan secara *in silico* pada situs Primer BLAST NCBI. Adapun analisis sekuen target masing-masing primer terdapat pada Tabel 8 di bawah ini.

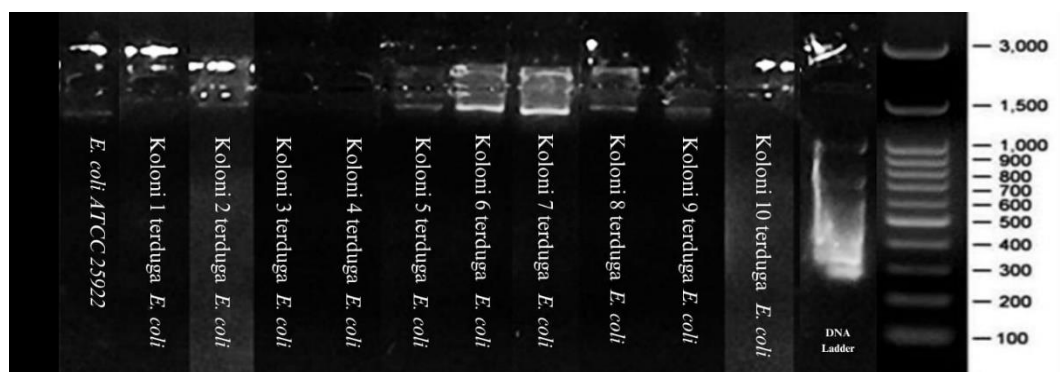
Tabel 8
Hasil BLAST Desain Primer

Nama primer	Sekuen primer	Jumlah strain terdeteksi	Jumlah strain <i>E. coli</i>	Jumlah strain selain <i>E. coli</i>
F1	TCTCCGTGAAGCTGGTTTCC	1000	875	125
R1	GCGACCAATCAGATCCACCA			
F2	ATCGGTGAAATACGCAGGCT	1000	978	22
R2	TCGTCACCTTGAATGGCAGG			

(NCBI Primer Blast)

2. Hasil Ekstraksi DNA

Analisis hasil ekstraksi ditunjukkan pada Gambar 7 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 7 Analisis Kualitatif Hasil Ekstraksi

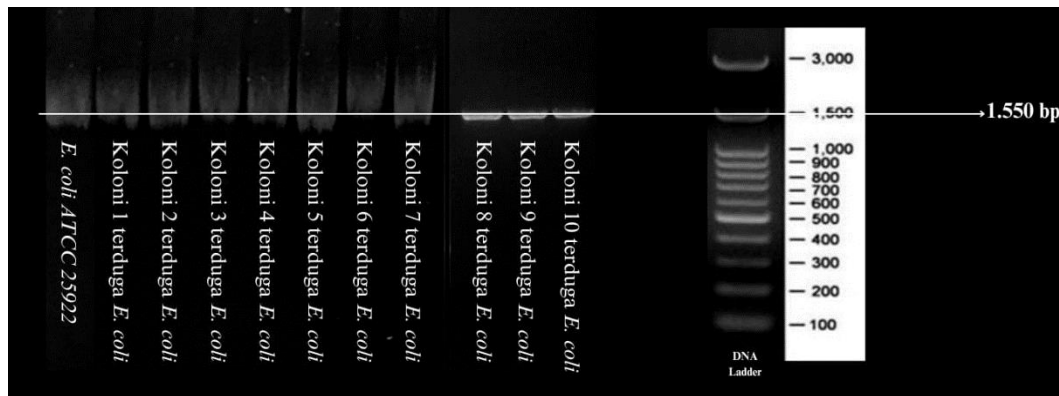
Pada gambar di atas terlihat ada beberapa sampel yang tidak memunculkan *band* DNA. Hasil ekstraksi DNA juga dianalisis konsentrasi dan kemurniannya secara kuantitatif dengan nanodrop spektrofotometer. Hasil analisis kualitatif dan kuantitatif DNA ditunjukkan pada Tabel 9 di bawah ini.

Tabel 9
Analisis Hasil Ekstraksi DNA

Kode	Sampel	Hasil Analisis Kualitatif	Hasil Analisis Kuantitatif	
			Konsentrasi (ng/ μ l)	Kemurnian (A_{260}/A_{280})
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Terlihat <i>band</i> redup	21,2	1,32
2	Koloni 1	Terlihat <i>band</i> redup	8,6	1,20
3	Koloni 2	Terlihat <i>band</i> redup	15,6	1,23
4	Koloni 3	Tidak terlihat <i>band</i>	18,3	1,27
5	Koloni 4	Tidak terlihat <i>band</i>	35,1	1,38
6	Koloni 5	Terlihat <i>band</i> redup	42,2	1,43
7	Koloni 6	Terlihat <i>band</i> jelas	31,8	1,61
8	Koloni 7	Terlihat <i>band</i> jelas	31,8	1,59
9	Koloni 8	Terlihat <i>band</i> jelas	16,7	1,46
10	Koloni 9	Terlihat <i>band</i> redup	19,4	1,37
11	Koloni 10	Terlihat <i>band</i> redup	24,4	1,37

(Data Primer, 2024)

Selain dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif, dilakukan uji keberadaan gen 16s rRNA pada DNA hasil ekstraksi dan didapatkan hasil sesuai Gambar 8 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

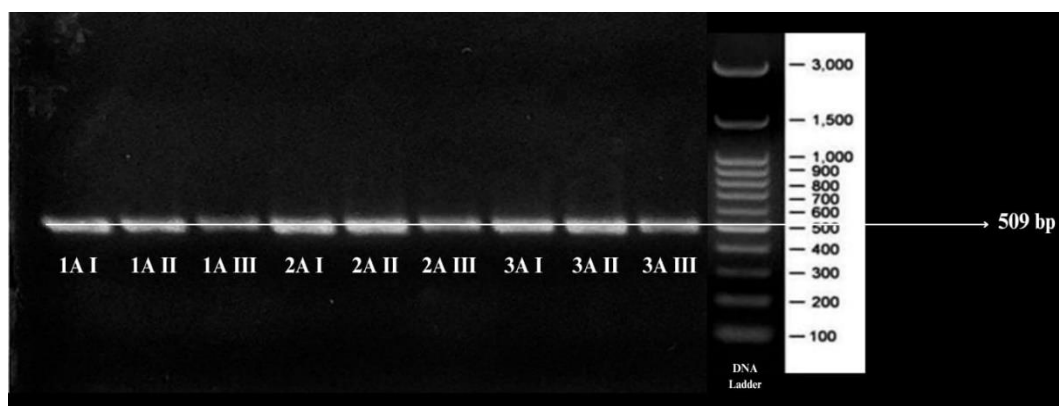
Gambar 8 Hasil Uji Keberadaan Gen 16s

Pada gambar di atas menunjukkan bahwa seluruh hasil ekstraksi positif mengandung gen 16s ditunjukkan dengan munculnya *band* berukuran 1.550 bp.

3. Optimasi *Nested* PCR

a. Hasil optimasi *Nested* PCR dengan tahap pertama 35 siklus

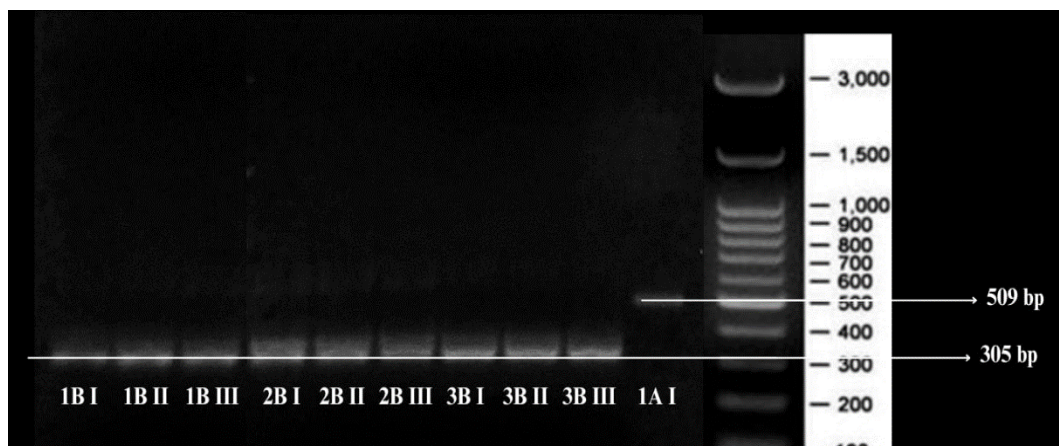
Optimasi *Nested* PCR tahap pertama dilakukan dengan primer pertama dengan tiga variasi konsentrasi primer, tiga variasi suhu *annealing*, dan jumlah siklus 35. Adapun hasil optimasi *Nested* PCR tahap pertama didapatkan hasil sesuai Gambar 9 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 9 Hasil *Nested* PCR Tahap Pertama 35 Siklus

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap pertama yang dilakukan dalam 35 siklus didapatkan *band* tunggal dengan ukuran 509 bp menandakan hasil positif, dengan *band* terbaik dihasilkan oleh sampel kode 1A I, yaitu DNA *E. coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi 300 mM primer dan suhu *annealing* 55°C. Amplikon 1A I kemudian dijadikan DNA template pada *Nested* PCR tahap 2 dan didapatkan hasil sesuai Gambar 10 di bawah ini.



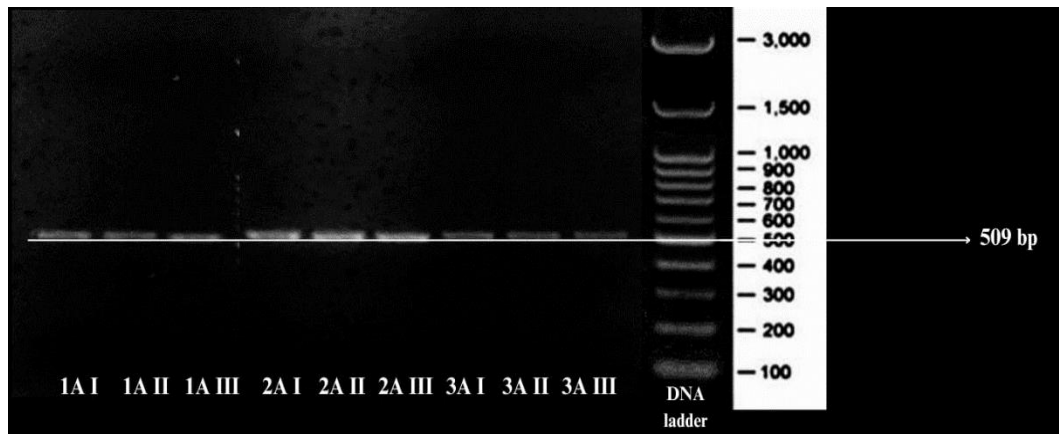
(Data Primer, 2024)

Gambar 10 Hasil *Nested* PCR Tahap Kedua dari Tahap Pertama 35 Siklus

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap kedua yang dilakukan dalam 35 siklus didapatkan *band* dengan *smear* dengan ukuran 305 bp serta terdapat *ghost band*.

b. Hasil optimasi *Nested* PCR dengan tahap pertama 30 siklus

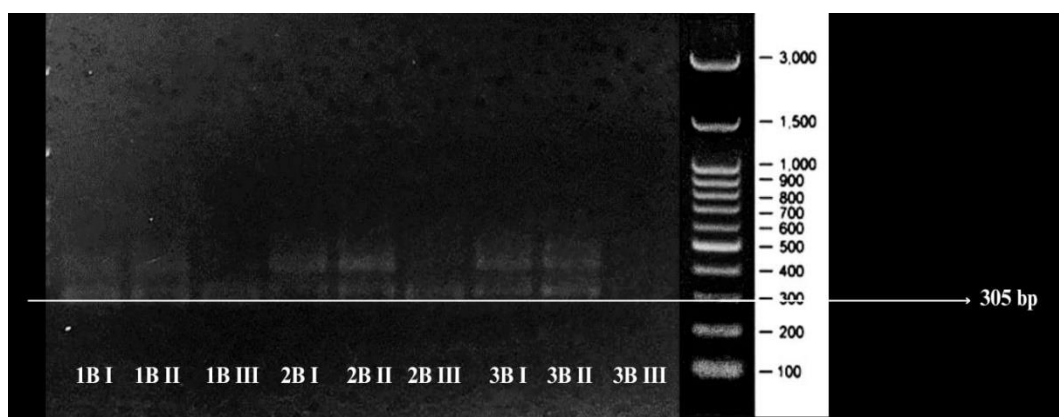
Optimasi *Nested* PCR tahap pertama dilakukan dengan primer pertama dengan tiga variasi konsentrasi primer, tiga variasi suhu *annealing*, dan jumlah siklus 30. Pada tahap ini didapatkan hasil sesuai Gambar 11 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 11 Hasil *Nested* PCR Tahap Pertama 30 Siklus

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap pertama yang dilakukan dalam 30 siklus didapatkan *band* tunggal dengan ukuran 509 bp menandakan hasil positif, dengan *band* terbaik dihasilkan oleh sampel kode 2A II, yaitu DNA *E. coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi 400 mM primer dan suhu *annealing* 60°C. Amplikon 2A II kemudian dilanjutkan pada *Nested* PCR tahap 2 dan didapatkan hasil sesuai Gambar 12 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 12 Hasil *Nested* PCR Tahap Kedua dari Tahap Pertama 30 Siklus

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap kedua yang dilakukan dalam 30 siklus didapatkan *band* dengan *smear* dengan ukuran 305 bp serta terdapat *ghost band*.

c. Hasil optimasi *Nested* PCR dengan tahap pertama 20 siklus

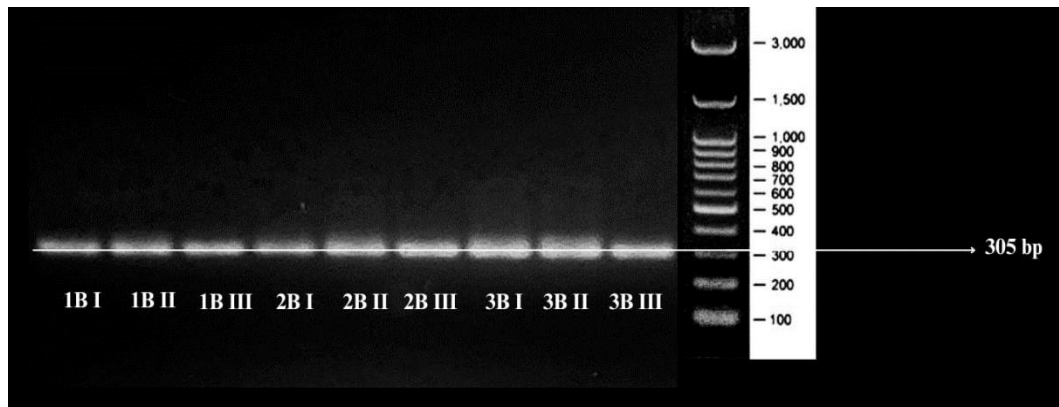
Optimasi *Nested* PCR tahap pertama dilakukan dengan primer pertama dengan tiga variasi konsentrasi primer, tiga variasi suhu *annealing*, dan jumlah siklus 20. Pada tahap ini diuji 9 sampel dengan DNA *E. coli* ATCC 25922 dan didapatkan hasil sesuai Gambar 13 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 13 Hasil *Nested* PCR Tahap Pertama 20 Siklus

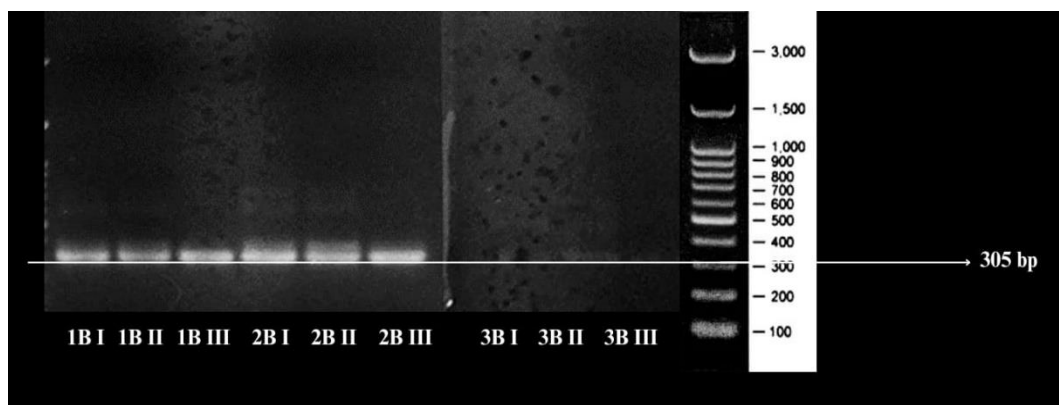
Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap pertama yang dilakukan dalam 20 siklus tidak ditemukan band pada seluruh reaksi. Amplikon sebagai DNA template pada *Nested* PCR tahap 2 dipilih menyesuaikan reaksi terbaik pada *Nested* PCR tahap pertama 35 dan 30 siklus yaitu sampel 1A I dan 2A II. Adapun hasil optimasi *Nested* PCR tahap kedua dari sampel 1A I didapatkan hasil sesuai Gambar 14 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 14 Hasil *Nested* PCR Tahap Kedua dari Tahap Pertama 20 Siklus Sampel 1A I

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap kedua yang dilakukan dalam 35 siklus didapatkan *band* tunggal dengan ukuran 305 bp. Tampak ada *smear* pada beberapa *band*, namun 1 *band* terbaik dihasilkan sampel kode 1B I, yaitu amplikon 1A I sebagai DNA template dengan konsentrasi 300 mM primer kedua dan suhu *annealing* 55°C. Sedangkan hasil optimasi *Nested* PCR tahap kedua dari sampel 2A II didapatkan hasil sesuai Gambar 15 di bawah ini



(Data Primer, 2024)

Gambar 15 Hasil *Nested* PCR Tahap Kedua dari Tahap Pertama 20 Siklus Sampel 2A II

Berdasarkan gambar didapatkan bahwa pada optimasi *Nested* PCR tahap kedua yang dilakukan dalam 35 siklus didapatkan *band* dengan *smear* dengan ukuran 305 bp serta terdapat *ghost band*.

Berdasarkan data hasil di atas, maka didapatkan reaksi optimal untuk *Nested* PCR menggunakan desain primer spesifik sesuai Tabel 10 di bawah ini.

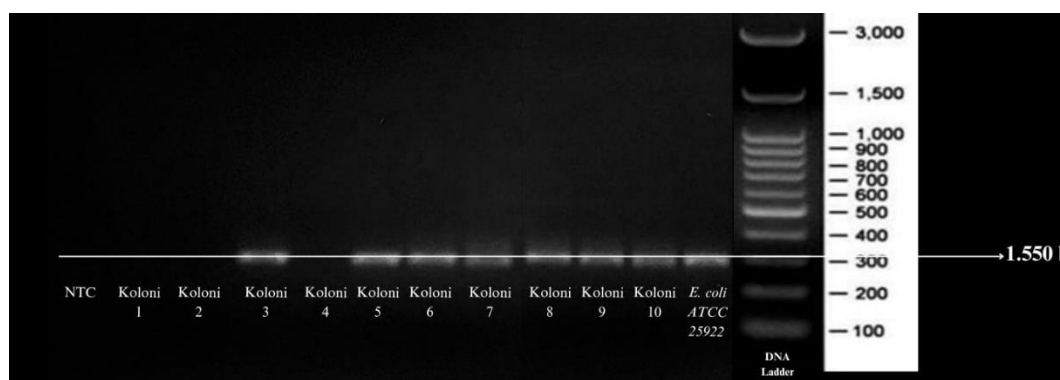
Tabel 10
Hasil Optimasi *Nested* PCR

Komponen optimasi	PCR tahap pertama	PCR tahap kedua
Jumlah siklus	20	35
Konsentrasi primer	300 mM	300 mM
Suhu penempelan primer	55 °C	55 °C

(Data Primer, 2024)

4. Hasil Identifikasi Bakteri *E. coli* Metode *Nested* PCR Dengan Primer Spesifik

Identifikasi bakteri dilakukan pada sampel DNA koloni bakteri terduga *E. coli* menggunakan desain primer spesifik dan reaksi *Nested* PCR optimal didapatkan hasil sesuai Gambar 16 di bawah ini.



(Data Primer, 2024)

Gambar 16 Hasil Pemeriksaan Sampel Koloni Terduga *E. coli* Dengan Primer Spesifik dan Reaksi *Nested* PCR Optimal

Berdasarkan hasil di atas, didapatkan hasil negatif pada NTC dan hasil positif pada sampel *E. coli* ATCC 25922 yang ditunjukkan dengan adanya *band* ukuran 305 bp. Pada 10 sampel koloni terduga *E. coli*, didapatkan hasil 3 sampel negatif dan 7 sampel positif ditunjukkan dengan munculnya *band* pada ukuran 305 bp.

B. Pembahasan

1. Desain Primer Spesifik *E. coli*

Desain primer dilakukan dengan metode *in silico* menggunakan situs bioinformatika. Desain primer diawali dengan pencarian *full genome E. coli* pada *GenBank* NCBI (Clark *et al.*, 2016). FASTA dari *full genome E. coli* (NC_000913.3) yang didapat kemudian disejajarkan dengan FASTA *full genome* bakteri *Shigella sp* (AE005674.2). Hasil pensejajaran didapatkan adanya 69259 dari 70086 sekuen yang sama (kemiripan 99%) dan hanya terdapat 42 gap atau perbedaan sekuen. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Akihary dkk. (2020) dan Ragupathi dkk. (2018) yang menyatakan adanya kemiripan spesies antara *E. coli* dengan *Shigella* hingga 99%. Primer didesain dengan memilih sekuen berukuran 1.859 bp yang menunjukkan perbedaan pada hasil pensejajaran. Desain primer dibuat dan dianalisis karakteristiknya pada laman Primer3plus (Sihotang dkk., 2021). Selain informasi pada laman Primer3, karakteristik primer dapat dilihat secara *in silico* pada laman benchling (Novarina *et al.*, 2022).

Primer didesain dengan memilih sekuen berukuran 1.859 bp yang menunjukkan perbedaan pada hasil pensejajaran. Desain primer yang didapatkan sebanyak 10 kandidat pasangan primer yang kemudian dipilih 1 pasang primer yang paling sesuai dengan syarat karakteristik primer. Pasangan primer pertama yang dihasilkan memiliki primer *forward* F1 5'TCTCCGTGAAGCTGGTTTCC3' dan

primer *reverse* R1 5'GCGACCAATCAGATCCACCA3' yang menghasilkan ukuran produk 509 bp. Amplikon yang dihasilkan oleh pasangan primer pertama kemudian dijadikan FASTA untuk melakukan desain pasangan primer kedua. Desain primer kedua didapatkan 10 kandidat primer yang dipilih 1 pasang primer yang paling sesuai dengan syarat karakteristik primer. Pasangan primer kedua yang didapatkan memiliki primer *forward* F2 5'ATCGGTGAAATACGCAGGCT3' dan primer *reverse* R2 5'TCGTCACCTTGAATGGCAGG3' yang menghasilkan ukuran produk 305 bp.

Desain primer yang dipilih harus memenuhi syarat karakteristik primer untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang baik. Syarat pertama yaitu memiliki ukuran 18 – 28 bp (Melati dkk., 2022). Primer yang berukuran kurang dari 18 bp akan menimbulkan terjadinya *misspriming*, yaitu penempelan primer di sembarang tempat dan tidak spesifik pada sekuen target (Nuryady dkk., 2020). Namun, primer yang terlalu panjang tidak akan menambah spesifisitasnya. Semakin panjang primer, maka amplikon yang dihasilkan akan semakin sedikit karena meningkatnya waktu proses pemanjangan (*extension*). Selain itu, ukuran primer yang terlalu panjang akan meningkatkan biaya produksi (Fakih dkk., 2021). Desain primer yang dihasilkan pada penelitian memiliki ukuran F1 20 bp, R1 20 bp, F2 20 bp, dan R2 20 bp sehingga secara ukuran memenuhi syarat karakteristik primer. Syarat kedua yaitu persentase guanin dan sitosin (%GC) berada pada rentang 40 – 60%. %GC yang terlalu tinggi dapat menurunkan spesifisitas primer, sedangkan %GC yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer tidak menempel secara selektif pada sekuen target (Melati dkk., 2022). Desain primer yang dihasilkan pada penelitian

memiliki %GC F1 55%, R1 55%, F2 50%, dan R2 55% sehingga secara %GC memenuhi syarat karakteristik primer.

Syarat ketiga yaitu memiliki *melting temperature* (T_m) antara 50 – 65°C dengan selisih antara T_m primer *forward* dan primer *reverse* tidak lebih dari 5°C (Melati dkk., 2022). T_m merupakan suhu saat untai ganda DNA terpisah 50% sehingga primer dapat menempel pada sekuen target. T_m memengaruhi suhu penempelan primer (suhu *annealing*) pada proses PCR. T_m yang terlalu tinggi dapat memengaruhi kualitas amplifikasi karena terjadinya penurunan efektivitas suhu *annealing* (T_a), sedangkan T_m yang terlalu rendah dapat menurunkan spesifisitas primer karena primer menempel pada sembarang tempat (Fakih dkk., 2021). Desain primer yang dihasilkan dalam penelitian memiliki T_m F1 60°C, R1 60,1°C, F2 59,8°C, dan R2 60,3°C sehingga memenuhi syarat karakteristik primer. Syarat keempat yaitu tidak adanya *hairpin* atau ikatan intramolekul pada primer karena dapat mengganggu proses penempelan primer pada template (Melati dkk., 2022). Pada primer yang dihasilkan, pemilihan pasangan primer dari 10 kandidat yang ada didasarkan pada tidak terbentuknya *hairpin* baik pada primer *forward* maupun primer *reverse*, sehingga primer yang didapat pada penelitian memenuhi standar nilai *hairpin*. Syarat kelima yaitu sekuen berulang tidak lebih dari 4 (contoh: ATATATAT) dan sekuen *run* tidak lebih dari 3 (contoh: CCC). Hal tersebut karena sekuen berulang dan sekuen *run* dapat menyebabkan *fals priming* (Sasmitha dkk., 2018).

Syarat keenam yaitu nilai energi bebas (ΔG) pada struktur sekunder berupa hibridisasi antar primer atau yang disebut dengan dimer. Terdapat dua macam dimer yang dapat dimiliki oleh primer. Homodimer yaitu terjadinya ikatan antara

primer sejenis (primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan primer *reverse*), dan heterodimer yaitu ikatan antar primer berbeda (primer *forward* dengan primer *reverse*). Adapun syarat ΔG untuk homodimer dan heterodimer yaitu lebih besar dari -6 kkal/mol (Melati dkk., 2022). Nilai ΔG menentukan stabilitas struktur sekunder primer, sehingga yang lebih kecil dari -6 kkal/mol akan menyebabkan primer sulit menempel pada sekuen target karena struktur sekunder yang terbentuk memiliki stabilitas tinggi (Fakih dkk., 2021). Desain primer pertama yang dihasilkan dalam penelitian memiliki ΔG homodimer F1 -3,97 kkal/mol, ΔG homodimer R1 -2,35 kkal/mol, dan ΔG heterodimer primer pertama yaitu -3,29 kkal/mol. Desain primer kedua memiliki ΔG homodimer F2 -3,45 kkal/mol, ΔG homodimer R2 -4,43 kkal/mol, dan ΔG heterodimer primer kedua yaitu -4,08 kkal/mol, sehingga secara keseluruhan desain primer memenuhi syarat karakteristik primer

Setelah kedua pasang primer yang memenuhi syarat karakteristik primer didapatkan, maka perlu dilakukan pengecekan spesifisitas primer untuk memastikan bahwa pasangan primer kedua tidak komplemen pada sekuen gen organisme selain *E. coli* yang sebelumnya komplemen pada pasangan primer pertama maupun sebaliknya. Pengecekan ini dapat dilakukan pada Primer BLAST NCBI (Saraswati dkk., 2019). Pada penelitian ini didapatkan bahwa pada primer pertama terdapat 125 dari 1000 sekuen selain *E. coli* yang komplemen pada primer dan seluruhnya tidak komplemen pada primer kedua. Pada primer kedua terdapat 22 dari 1000 sekuen selain *E. coli* yang komplemen pada primer dan seluruhnya tidak komplemen pada primer pertama. Dengan demikian, pasangan primer pertama dan kedua spesifik terhadap *E. coli* dalam pemeriksaan *Nested PCR*.

2. Hasil Ekstraksi DNA

Koloni bakteri dibuat suspensi dengan NaCl steril kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan metode PCIA. Metode PCIA merupakan *gold standard* ekstraksi DNA yang diambil dari suspensi koloni bakteri (Shetty, 2020). Pada proses ekstraksi dengan metode PCIA menggunakan *chloroform* yang berperan dalam melarutkan protein, lemak, dan molekul selain DNA seperti polisakarida serta mengandung fenol yang dapat memaksimalkan proses ekstraksi karena memiliki kemampuan berikatan dengan protein. Pada proses ekstraksi akan terbentuk 3 lapisan, yaitu supernatant yang mengandung DNA, lapisan protein di tengah, dan *chloroform* sebagai bagian terbawah karena memiliki berat molekul tinggi (Murtiyaningsih, 2017). Proses ekstraksi diakhiri dengan pencucian menggunakan alkohol 70% untuk menghilangkan sisa fenol dan meninggalkan pelet DNA yang kemudian dilarutkan dengan TE buffer (Sophian, 2021). Hasil ekstraksi dianalisis secara kualitatif dengan metode gel elektroforesis dan didapatkan bahwa tidak semua sampel menghasilkan *band* DNA. Selain itu, DNA ladder yang digunakan dalam pemeriksaan belum terpisah dengan baik menjadi *band* tunggal dan masih menempel satu sama lain. Hal tersebut dapat disebabkan karena ketidaksesuaian tegangan dan waktu yang digunakan dalam proses elektroforesis. Waktu yang digunakan dalam elektroforesis dapat memengaruhi laju migrasi (elektromobilitas) molekul DNA. Semakin kecil ukuran molekul, maka elektromobilitasnya semakin tinggi sehingga memerlukan waktu migrasi yang lebih panjang (Butet *et al.*, 2019).

Pemeriksaan dilanjutkan secara kuantitatif dengan nanodrop spektrofotometer untuk memeriksa konsentrasi dan kemurnian hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi yang

baik memiliki konsentrasi lebih dari 20 ng/ μ l (Sophian, 2021). Pada Tabel 9 menunjukkan konsentrasi hasil ekstraksi berada pada rentang 8,6 – 42,2 ng/ μ l. konsentrasi DNA yang rendah dapat dipengaruhi oleh proses ekstraksi DNA. Selain konsentrasi, syarat DNA hasil ekstraksi yang baik memiliki rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm dalam rentang 1,8- 2,0 yang menunjukkan Tingkat kemurnian DNA yang baik (Murtiyaningsih, 2017). A260 atau absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm sedangkan A280 merupakan absorbansi protein pada panjang gelombang 280 nm (Wulansari *et al.*, 2016). Pada penelitian didapatkan rasio A260/280 kurang dari 1,8 menunjukkan DNA hasil ekstraksi memiliki kemurnian yang rendah. Menurunnya rasio hingga kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein pada hasil ekstraksi (Koetsier *et al.*, 2019). Kontaminasi protein dapat disebabkan karena masih adanya sisa fenol karena proses pencucian dengan alkohol 70% tidak berlangsung secara maksimal sehingga masih terdapat sisa fenol yang berikatan dengan protein pada hasil ekstraksi (Sophian, 2021).

Pemeriksaan dilanjutkan dengan menguji keberadaan gen 16s rRNA pada DNA sampel. Gen 16s rRNA merupakan subunit yang dapat digunakan sebagai identifikasi bakteri dan terdapat pada semua strain bakteri (Winand *et al.*, 2019). Oleh karena itu, pengujian 16s rRNA dilakukan untuk memeriksa apakah dalam DNA hasil ekstraksi terdapat DNA bakteri atau tidak. Hasil pemeriksaan didapatkan hasil positif pada seluruh sampel ditunjukkan dengan munculnya *band* pada ukuran 1.550 bp. Dengan demikian, hasil ekstraksi mengandung DNA bakteri dan dapat dilanjutkan pada pemeriksaan *Nested* PCR.

3. Optimasi Reaksi *Nested* PCR

Optimasi *Nested* PCR dilakukan pada jumlah siklus *Nested* PCR tahap pertama, konsentrasi dan suhu *annealing* primer pertama untuk *Nested* PCR tahap pertama, serta konsentrasi dan suhu *annealing* primer kedua untuk *Nested* PCR tahap kedua. Variasi jumlah siklus *Nested* PCR tahap pertama yaitu 35 siklus, 30 siklus, dan 20 siklus. Variasi konsentrasi primer yang digunakan yaitu 300 mM, 400 mM, dan 500 mM. variasi suhu *annealing* yang digunakan yaitu 55°C, 60°C, dan 65 °C. Dalam optimasi setiap tahap *Nested* PCR, dilakukan variasi tiga konsentrasi primer dan tiga variasi suhu *annealing* sehingga terdapat 9 sampel DNA *E. coli* ATCC 25922 yang diuji dalam reaksi yang berbeda.

Optimasi jumlah siklus dilakukan pada tahap pertama karena amplicon *Nested* PCR tahap pertama akan digunakan sebagai template pada *Nested* PCR tahap kedua. Jumlah siklus PCR akan berpengaruh pada konsentrasi DNA yang terdapat pada amplicon. Semakin banyak jumlah siklus, maka konsentrasi DNA dalam amplicon akan meningkat. Apabila konsentrasi DNA template pada suatu reaksi terlalu tinggi, dapat menghambat proses amplifikasi (Safanah dkk., 2019). Pada optimasi *Nested* PCR dengan tahap pertama dilakukan dalam 35 siklus dan 30 siklus didapatkan bahwa analisis hasil *Nested* PCR tahap pertama ditemukan *band* tunggal berukuran 509 bp pada seluruh variasi konsentrasi primer dan suhu *annealing*. Pada analisis hasil *Nested* PCR tahap kedua ditemukan *band* pada ukuran 305 bp *ghost band*. *Ghost band* atau *artefactual band* merupakan *band* redup selain target yang muncul pada hasil gel elektroforesis. Munculnya *ghost band* dapat disebabkan oleh adanya dimer homolog DNA template, yaitu terjadinya ikatan antar ujung DNA template pada proses denaturasi yang turut melalui proses

pemanjangan sehingga menghasilkan produk yang tidak diharapkan (Raab *et al.*, 2023).

Pada optimasi *Nested* PCR dengan tahap pertama dilakukan dalam 20 siklus didapatkan bahwa analisis hasil *Nested* PCR tahap pertama tidak ditemukan *band* pada seluruh variasi konsentrasi primer dan suhu *annealing*. Oleh karena itu, pemilihan sampel yang dilanjutkan sebagai template *Nested* PCR tahap kedua menyesuaikan amplikon terbaik pada 30 siklus yaitu sampel 1A I dan 35 siklus yaitu sampel 2A II. Pada analisis hasil *Nested* PCR tahap kedua sampel 2A II ditemukan *band* berukuran 305 bp *ghost band*. Hal tersebut dapat disebabkan karena tidak seimbangnya konsentrasi DNA template dan konsentrasi primer, sehingga terjadi dimer antar primer maupun dimer DNA template (Raab *et al.*, 2023; Setyawati dkk, 2021). Meski demikian, pada analisis hasil *Nested* PCR tahap kedua sampel 1A I dihasilkan *band* tunggal pada seluruh sumur dengan satu amplikon terbaik pada sampel 1B I. Dengan demikian, jumlah siklus *Nested* PCR tahap pertama sebanyak 20 memberikan hasil terbaik. Selain itu, *Nested* PCR dengan tahap pertama sebanyak 20 siklus memerlukan waktu yang lebih singkat dibandingkan 35 dan 30 siklus sehingga 20 siklus dipilih sebagai hasil optimasi siklus terbaik.

Pada uji optimasi juga dilakukan pada konsentrasi primer, baik pada primer pertama maupun primer kedua. Variasi konsentrasi primer dipilih sesuai dengan KIT reaksi PCR yang digunakan. Pada KIT PCR dicantumkan bahwa konsentrasi primer yang direkomendasikan yaitu 400 mM, namun dapat divariasikan mulai dari 100 mM hingga 1000 mM sesuai dengan karakteristik primer yang digunakan. Oleh karena itu, dipilih tiga variasi konsentrasi primer pada penelitian, yaitu 300 mM,

400 mM, dan 500 mM. Hasil optimasi didapatkan bahwa konsentrasi terbaik untuk *Nested* PCR tahap pertama yaitu 300 mM dan untuk *Nested* PCR tahap kedua 300 mM. Konsentrasi primer yang terlalu rendah dan tinggi dapat menyebabkan tidak adanya amplifikasi dan juga bisa menyebabkan pembentukan primer dimer (keadaan dimana band yang terbentuk diikuti oleh band lain yang tidak spesifik) (Setyawati dkk., 2021).

Pada uji optimasi juga dilakukan pada suhu *annealing*, baik pada primer pertama maupun primer kedua. Variasi suhu *annealing* ditentukan dengan perhitungan rata-rata melting temperature primer (T_m) primer *forward* dan primer *reverse* kemudian dihitung menggunakan rumus $(T_m - 5)^{\circ}\text{C}$ hingga $(T_m + 5)^{\circ}\text{C}$. Adapun rata-rata T_m baik primer pertama maupun kedua adalah 60. Oleh karena itu, dipilih tiga variasi suhu *annealing* pada penelitian, yaitu 55°C , 60°C , dan 65°C . Hasil optimasi didapatkan bahwa suhu *annealing* terbaik untuk *Nested* PCR tahap pertama yaitu 55°C dan untuk *Nested* PCR tahap kedua 55°C . Suhu *annealing* sangat berpengaruh terhadap proses penempelan primer pada template DNA. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada template hal ini ditandai dengan semakin tipisnya band yang terbentuk, sedangkan suhu *annealing* yang rendah menyebabkan primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan menyebabkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan (Setyawati dkk., 2021).

4. Hasil Identifikasi Bakteri *E. coli* Metode *Nested* PCR Dengan Primer Spesifik

Identifikasi *E. coli* dengan metode *Nested* PCR menggunakan desain primer spesifik dilakukan pada 10 koloni terduga *E. coli* yang diremajakan di laboratorium

terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar. Hasil pemeriksaan pada 10 sampel koloni terduga *E. coli* didapatkan hasil 3 sampel negatif dan 7 sampel positif ditunjukkan dengan munculnya *band* pada ukuran 305 bp. Validitas hasil pemeriksaan dapat dilihat pada adanya hasil negatif pada NTC yang menunjukkan tidak terdapat kontaminasi pada pemeriksaan dan hasil positif pada sampel DNA *E. coli* ATCC 25922 ditunjukkan dengan adanya *band* ukuran 305 bp menunjukkan proses PCR dan reagen yang digunakan berfungsi dengan baik. Hasil penelitian menunjukkan primer bekerja dengan baik. Dengan demikian, hasil negatif pada sampel dapat disebabkan karena koloni yang diekstraksi bukan merupakan koloni *E. coli*.

Penelitian Lehniger *et al.* (2021) telah mengembangkan metode deteksi sel hidup *E. coli* dengan menggabungkan *direct* PCR, *viability* PCR, dan *nested* PCR dalam proses pengujian. Penelitian dengan penggunaan hanya *nested* PCR telah dilakukan dalam deteksi bakteri genus *Escherichia* dan didapatkan hasil bahwa metode *nested* PCR dapat menghasilkan produk PCR pada sampel *Escherichia albertii* namun tidak menghasilkan produk PCR pada sampel *E. coli* (Ooka *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, metode *nested* PCR diuji untuk mendeteksi bakteri *E. coli* secara spesifik dan didapatkan hasil terbentuknya produk hasil PCR dari sampel terduga *E. coli* dengan ukuran ampikon yang sesuai dengan karakteristik primer yang juga didesain dalam penelitian ini.

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan yaitu proses ekstraksi DNA dilakukan dari koloni bakteri sehingga masih memerlukan proses kultur. Penelitian lanjutan perlu dikembangkan dengan memeriksa DNA hasil ekstraksi sampel secara langsung untuk meningkatkan validitas pemeriksaan. Meski demikian, pemeriksaan dengan metode *Nested* PCR yang dilakukan pada penelitian telah

mempersingkat waktu identifikasi bakteri karena tidak memerlukan proses uji pendugaan dan uji biokimia. Identifikasi *E. coli* secara konvensional memerlukan waktu 6 – 8 hari (Fhitryani dkk., 2017) sedangkan dalam penelitian ini, identifikasi *E. coli* dapat dilakukan dalam waktu 3 hari. Dengan pengembangan ekstraksi DNA dari sampel secara langsung, metode ini berpotensi dapat melakukan identifikasi *E. coli* dalam waktu 1 – 2 hari. Dengan demikian, metode *nested* PCR menggunakan desain primer spesifik dapat digunakan sebagai deteksi bakteri *E. coli*.