

DESAIN PRIMER DAN PEMURNIAN GANDA UNTUK DETEKSI PCR GEN 16S rRNA PADA *ESCHERICHIA COLI*

PRIMER DESIGN AND DUAL PURIFICATION FOR PCR DETECTION OF 16S rRNA GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

¹Deivan Pradana Putra*, ²Arya Iswara, ³Qolaima Hanifah, ⁴Diffa Indah Natasya
Adam, ⁵Agistha Naftalia Putri

^{1,3,4}Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang

²Departemen Magister Ilmu Laboratorium Klinik, Pascasarjana, Universitas Muhammadiyah Semarang

⁵Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Pelita Harapan

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Submitted: 06-03-
2025

Accepted: 06-10-2025

Publish Online: 29-
12-2025

Kata Kunci:

Gen 16S rRNA,
Escherichia coli,
Spesifitas primer,
Pemurnian ganda,
Amplifikasi PCR

Keywords:

16S rRNA, *Escherichia coli*,
Primer specificity,
Dual purification, PCR
amplification

Abstrak

Latar Belakang: Infeksi akibat *Escherichia coli* masih menjadi permasalahan penting dalam bidang mikrobiologi klinik karena dapat menimbulkan penyakit serius seperti infeksi saluran kemih dan sepsis. Deteksi molekuler berbasis PCR menjadi metode yang cepat dan sensitif, namun keberhasilannya sangat dipengaruhi oleh kualitas DNA dan spesifisitas primer. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan merancang dan mengevaluasi primer spesifik gen 16S rRNA *E. coli* secara *in silico* menggunakan NCBI Primer Blast serta menguji efektivitas metode purifikasi ganda untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi. **Metode:** Primer Pair 2 (Forward: 5'-CCTTAGGGCCTCTTGCCATC-3' Reverse: 5'-GAGCGTCAGTCTTCGTCCAG-3') dipilih berdasarkan panjang oligonukleotida, T_m, kandungan GC, posisi target, dimer ujung 3', dan self-complementarity. Pemurnian ganda diterapkan untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi guna memastikan amplifikasi PCR yang optimal. **Hasil:** PCR menghasilkan produk 553 bp yang dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa 2%. *Pseudomonas aeruginosa* sebagai kontrol tidak menunjukkan amplifikasi, mengonfirmasi spesifisitas Primer Pair 2. **Kesimpulan:** Primer Pair 2 efektif untuk amplifikasi spesifik gen 16S rRNA *Escherichia coli*, sehingga direkomendasikan untuk meningkatkan spesifisitas dan akurasi deteksi dalam penelitian selanjutnya.

Abstract

Background: *Escherichia coli* infection remains a major concern in clinical microbiology as it can cause serious diseases such as urinary tract infections and sepsis. PCR-based molecular detection offers a rapid and sensitive approach; however, its success is highly dependent on DNA quality and primer specificity. **Objective:** This study aimed to design and evaluate *in silico* a specific primer pair targeting the *E. coli* 16S rRNA gene using NCBI Primer-BLAST and to assess the effectiveness of a double purification method for obtaining high-quality DNA. **Method:** Primer Pair 2 (Forward: 5'-CCTTAGGGCCTCTTGCCATC-3', Reverse: 5'-GAGCGTCAGTCTTCGTCCAG-3') was selected based on oligonucleotide length, T_m, GC content, target position, 3'-end dimer formation, and self-complementarity. Dual purification was applied to obtain high-quality DNA, ensuring optimal PCR amplification. **Results:** PCR produced a 553 bp product confirmed by 2% agarose gel electrophoresis. *Pseudomonas aeruginosa* was used as a specificity control and showed no amplification, confirming the specificity of Primer Pair 2. **Conclusions:** Primer Pair 2 is effective for specific amplification of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene and is recommended for future research to enhance specificity and accuracy in *Escherichia coli* detection.

PENDAHULUAN

Escherichia coli (*E. coli*) dan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) merupakan bakteri gram-negatif yang penting baik di lingkungan maupun dalam konteks klinis. *Escherichia coli* umumnya ditemukan di usus manusia dan hewan sebagai bagian dari flora normal, tetapi dapat menyebabkan infeksi seperti infeksi saluran kemih, sepsis, dan meningitis (Jaybhaye dan Deb, 2021). *Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen oportunistik yang dikenal dengan tingkat resistensi tinggi terhadap antibiotik, sehingga dapat menimbulkan infeksi serius pada individu dengan sistem imun yang lemah, seperti pneumonia, infeksi aliran darah, dan infeksi luka (Paprocka et al., 2022).

Gen 16S rRNA pada *E. coli* dan *P. aeruginosa* merupakan gen yang sangat terkonservasi dan telah digunakan secara luas sebagai penanda genetik dalam identifikasi bakteri maupun studi filogenetik (Janda and Abbott, 2007). Perbedaan efisiensi ekstraksi DNA pada kedua bakteri tersebut dipengaruhi oleh variasi struktur dinding sel. *E. coli* memiliki struktur dinding sel yang relatif sederhana, sedangkan *P. aeruginosa* menunjukkan dinding sel yang lebih kompleks dan kuat, dengan tambahan lapisan alginat serta lipopolisakarida. Kompleksitas ini dapat menghambat proses ekstraksi serta amplifikasi DNA (Reshes et al., 2008; Elfadadny et al., 2024).

Polymerase Chain Reaction (PCR) secara selektif memperbanyak segmen DNA tertentu dengan menggunakan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA komplementer setelah proses denaturasi (Khehra et al., 2023). PCR banyak digunakan karena memiliki spesifisitas, kecepatan, dan sensitivitas yang tinggi (Fitri et al., 2022). Metode ini memungkinkan replikasi urutan DNA target untuk analisis lebih lanjut (Ehtisham et al., 2016). Kemurnian DNA sangat penting bagi akurasi dan efisiensi amplifikasi PCR. Kontaminan seperti protein, polisakarida, dan senyawa fenolik dapat menghambat aktivitas DNA polimerase, sehingga menurunkan efisiensi amplifikasi bahkan dapat menyebabkan kegagalan total pada proses PCR. Oleh karena itu, proses purifikasi DNA yang efektif sangat diperlukan untuk menghilangkan inhibitor dan memperoleh DNA berkualitas tinggi yang sesuai untuk amplifikasi yang andal (Branquinho, Ferreira dan Cardarelli-Leite, 2012).

Proses purifikasi ganda dapat meningkatkan kemurnian DNA dengan menghilangkan kontaminan secara bertahap yang mungkin tidak terangkat dalam satu tahap purifikasi. Pendekatan ini bermanfaat ketika metode purifikasi awal menghasilkan DNA dengan kemurnian yang kurang optimal. Namun, penting untuk dipertimbangkan bahwa meskipun purifikasi ganda dapat meningkatkan kualitas DNA, proses tambahan ini berpotensi menurunkan hasil DNA karena adanya tahapan pemrosesan yang lebih banyak. Oleh sebab itu, optimalisasi protokol purifikasi sangat penting untuk menyeimbangkan antara kemurnian dan hasil DNA, sehingga diperoleh DNA berkualitas tinggi dalam jumlah yang memadai untuk amplifikasi PCR yang andal (Green and Sambrook, 2019).

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam deteksi spesifik *E. coli* menggunakan amplifikasi gen 16S rRNA melalui PCR, dengan *P. aeruginosa* sebagai kontrol spesifisitas. Tujuan utama penelitian ini adalah merancang dan mengevaluasi primer secara *in silico* untuk memastikan spesifisitas tinggi terhadap *E. coli*. Selain itu, metode purifikasi ganda diterapkan untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi, yang kemudian diverifikasi melalui PCR dan analisis DNA ladder guna melakukan pemeriksaan silang terhadap hasil amplifikasi.

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam deteksi spesifik *E. coli* menggunakan amplifikasi gen 16S rRNA melalui PCR, dengan *P. aeruginosa* sebagai kontrol spesifisitas. Tujuan utama penelitian ini adalah merancang dan mengevaluasi primer secara *in silico* untuk memastikan spesifisitas tinggi terhadap *E. coli*, serta menerapkan metode purifikasi ganda untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi yang diverifikasi melalui PCR dan analisis DNA ladder. Penelitian ini penting dilakukan karena desain primer yang tepat dan pemurnian DNA yang optimal menentukan akurasi hasil PCR dan keberhasilan deteksi molekuler. Di tengah meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik, kemampuan mendeteksi patogen secara spesifik menjadi krusial untuk mencegah salah identifikasi dan mendukung pengembangan strategi terapi yang efektif.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan molekuler, yang bertujuan merancang dan memvalidasi primer spesifik gen 16S rRNA pada *E. coli*. Desain penelitian difokuskan pada analisis *in silico*, amplifikasi PCR, serta validasi menggunakan kontrol spesifisitas *Pseudomonas aeruginosa*.

Sasaran Penelitian

Sampel penelitian berupa strain *E. coli* dan *P. aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang (UNIMUS). Populasi sasaran penelitian adalah bakteri gram-negatif, sedangkan sampel penelitian dipilih secara purposive karena mewakili spesies target (*E. coli*) dan kontrol spesifisitas (*P. aeruginosa*).

Teknik Pengumpulan Data dan Pengembangan Instrumen

Data diperoleh melalui beberapa tahapan. Pertama, urutan gen 16S rRNA *E. coli* (Gene ID: NR_024570.1) diunduh dari basis data NCBI dalam format FASTA dan digunakan untuk merancang kandidat primer dengan perangkat *NCBI Primer Blast*. Kandidat primer kemudian dianalisis berdasarkan panjang oligonukleotida, T_m, kandungan GC, self-complementarity, dan kemungkinan pembentukan dimer. Kedua, ekstraksi DNA dilakukan melalui proses lisis sel, pemisahan fenol-kloroform, dan presipitasi etanol, dengan hasil ekstraksi DNA selanjutnya dilarutkan dalam buffer Tris-EDTA (TE). Ketiga, pemurnian DNA dilakukan untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi menggunakan metode pemurnian ganda dengan Maestro NanoPro. Purifikasi pertama bertujuan menghilangkan protein dan kontaminan seluler, sedangkan purifikasi kedua menghilangkan sisa pengotor, dengan evaluasi kemurnian DNA berdasarkan rasio A260/A280 dan A260/A230 menggunakan spektrofotometer Maestro NanoPro. Keempat, amplifikasi PCR dilaksanakan menggunakan PowerPol 2X PCR Mix dengan sepasang primer terpilih. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal, 30 siklus denaturasi, annealing, dan ekstensi, serta ekstensi akhir pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 2% dengan pembanding DNA ladder, dan validasi dilakukan dengan perangkat lunak Gel Analyzer 23.1.1 untuk menilai ukuran fragmen serta spesifisitas primer.

Teknik Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil elektroforesis PCR, pengukuran konsentrasi DNA, serta rasio kemurnian DNA. Analisis *in silico* digunakan untuk menentukan primer terbaik berdasarkan parameter bioinformatika. Produk PCR kemudian diverifikasi dengan perbandingan terhadap DNA ladder dan analisis menggunakan Gel Analyzer 23.1.1. Keberhasilan primer ditentukan dari munculnya fragmen DNA spesifik berukuran 553 bp pada *E. coli* dan tidak adanya amplifikasi pada *P. aeruginosa*.

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer gen 16S rRNA *E. coli* dan mengevaluasi spesifisitasnya dengan menggunakan *P. aeruginosa* sebagai kontrol. *E. coli* dikultur pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), sedangkan *P. aeruginosa* ditumbuhkan pada media MacConkey Agar. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, koloni yang terisolasi dipindahkan ke dalam *Brain Heart Infusion* (BHI) broth dan diinkubasi dalam kondisi aerob untuk memastikan pertumbuhan bakteri yang optimal (Hawkins et al., 2019)

Ekstraksi DNA dilakukan melalui tiga tahapan utama, yaitu lisis, pemisahan fenol-kloroform, dan presipitasi etanol (Maheshwari et al., 2022; Moynihan, 2021; Lesiani et al., 2023). DNA hasil ekstraksi kemudian dilarutkan dalam buffer Tris-EDTA (TE) dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis lebih lanjut (Oechsle et al., 2024)

Untuk mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA, dilakukan proses pemurnian ganda menggunakan sistem Maestro NanoPro. Purifikasi pertama bertujuan menghilangkan protein dan kontaminan seluler lainnya, sedangkan purifikasi kedua menghilangkan sisa pengotor sehingga meningkatkan kualitas DNA. Efektivitas pemurnian ganda ini dievaluasi dengan mengukur konsentrasi DNA (ng/μL) serta rasio kemurnian (A260/A280 dan A260/A230) untuk menilai adanya kontaminasi protein maupun garam, sehingga memastikan DNA layak digunakan dalam amplifikasi PCR (Panda, Meher and Hazra, 2019; Hidayati et al., 2021).

Tabel 1. Hasil Pemurnian Ganda dan Pengukuran Konsentrasi DNA

Sampel DNA	Tahap Pemurnian	Konsentrasi DNA (ng/μL)	Rasio A260/A280	Rasio A260/A230
<i>Escherichia coli</i>	Pemurnian Pertama	809,44	2,314	1,713
	Pemurnian Kedua*	122,28	4,945	4,196
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pemurnian Pertama	1106,17	1,667	1,758
	Pemurnian Kedua*	21,90	1,944	2,172

Keterangan: *(data yang digunakan untuk PCR)

Tabel 2. Komposisi Campuran Reaksi PCR

Komponen (μL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
PowerPol 2X PCR Mix	25	25
DNA Template*	4,57	0,81
Forward Primer	1	1
Reverse Primer	1	1
Nuclease-Free Water (NFW)	18,43	22,19
Total Volume (μL)	50	50

Keterangan: *(perhitungan volume DNA template)

Amplifikasi PCR ditujukan pada gen 16S rRNA dengan menggunakan PowerPol 2X PCR Mix. Campuran reaksi terdiri atas DNA template, primer forward dan reverse, dNTPs, serta enzim Taq polymerase. PCR dilakukan menggunakan ELVE-32G Gradient Thermal Cyclers dengan denaturasi awal pada suhu 98°C, diikuti dengan 30 siklus denaturasi, annealing, dan ekstensi, serta diakhiri dengan tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C (Handoyo and Rudiretna, 2001)

Dalam penelitian ini, primer dirancang berdasarkan gen 16S rRNA *E. coli* yang tersedia di GeneBank (Gene ID: NR_024570.1). Perancangan primer dilakukan secara *in silico* menggunakan situs web “NCBI Primer Blast”. Kandidat primer kemudian dianalisis untuk memilih pasangan primer terbaik yang memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Analisis mempertimbangkan beberapa aspek penting, termasuk panjang primer optimal yaitu 18–30 pasangan basa. Primer yang terlalu pendek berpotensi menyebabkan mispriming (penempelan tidak spesifik), sedangkan primer yang lebih panjang dari 30 pasangan basa dapat menyebabkan hibridisasi berlebihan sehingga menghambat proses polimerisasi DNA (Van Pelt-Verkuil, 2008).

“NCBI Primer Blast” menghasilkan 10 rekomendasi primer dengan spesifikasi yang tercantum pada Tabel 3. Salah satu kriteria utama dalam pemilihan primer adalah suhu leleh (T_m), yaitu suhu ketika 50% DNA beruntai ganda terpisah. Rentang T_m yang ideal adalah 50–65°C. T_m berpengaruh terhadap suhu annealing yang digunakan dalam reaksi PCR. Apabila T_m terlalu rendah, primer dapat menempel secara non-spesifik pada daerah lain sehingga menurunkan spesifisitas produk PCR. Sebaliknya, jika T_m terlalu tinggi (di atas 65°C), efisiensi penempelan primer menurun sehingga menyebabkan amplifikasi DNA target tidak optimal (Fakih et al., 2021). Selain itu, perbedaan nilai T_m antara primer forward dan reverse harus seminimal mungkin agar penempelan selama proses PCR berlangsung secara efisien. Dalam penelitian ini, primer dipilih dengan nilai T_m yang seimbang antara primer forward dan reverse untuk mengoptimalkan suhu annealing dalam reaksi PCR.

Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence

NCBI Reference Sequence: NR_024570.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NR_024570.1 Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence
AGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAG
CAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGA
TAACACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGCACAAAGAGGGGACCTTAGGGCTCTT
GCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAACGGCTCACCTAGGCACGATCCCTAG
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCAACACTGGAACAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCNGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAGCGCACGCGAGGCGGTTTGAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATCTG
ATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAGCGTGGGAGC
AAACAGGATTAGTACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGCG
TGGCTTCGGGANNTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA
TTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCTGGTC
TTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGTCGTGTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCA
GCGGTCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTC
ATCATGGCCCTTACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAG
AGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACA
CCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCG
```

Gambar 1. Format FASTA gen 16S rRNA *Escherichia coli*
Sumber: National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Basa guanin (G) dan sitosin (C) bersifat komplementer serta dihubungkan oleh tiga ikatan hidrogen. Persentase dari basa ini dinyatakan sebagai %GC, yang idealnya berada pada kisaran 40–60% pada suatu primer. Jumlah guanin dan sitosin yang optimal akan meningkatkan kemampuan ikatan spesifik primer terhadap templat DNA. Sebaliknya, kandungan GC yang rendah akan menurunkan spesifisitas ikatan primer (Pradnyaniti et al., 2010). Untuk mencegah terjadinya dimerisasi primer, jumlah basa G dan C pada lima basa terakhir ujung 3' sebaiknya tidak lebih dari tiga. Basa GC pada ujung 3' memang dapat meningkatkan stabilitas ikatan primer–templat selama PCR, tetapi apabila jumlahnya melebihi tiga, spesifisitas dapat menurun karena basa AT lebih toleran terhadap mismatch dibandingkan basa GC. Dimer terbentuk ketika primer dengan urutan identik mengalami hibridisasi. Jika dimer terjadi, DNA polimerase akan menempel pada wilayah identik tersebut dan memperpanjang keduanya, sehingga efisiensi amplifikasi menurun dan berpotensi menghasilkan produk yang tidak diinginkan (Van Pelt-Verkuil, 2008). Semua primer yang direkomendasikan dalam penelitian ini memenuhi kriteria tersebut karena jumlah dimer pada ujung 3' tidak melebihi tiga.

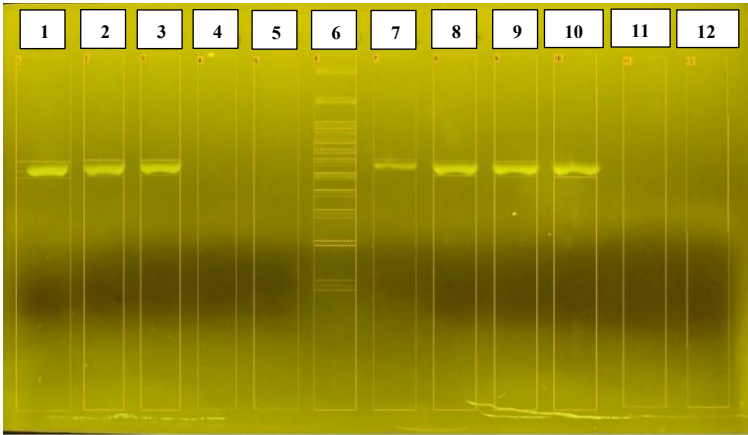
Self-complementarity merupakan parameter yang digunakan untuk memprediksi kemungkinan terbentuknya struktur tiga dimensi akibat dimerisasi primer, baik antarprimer maupun dalam satu primer itu sendiri. Nilai self-complementarity yang rendah lebih disukai untuk mencegah ikatan nonspesifik dan mengurangi produk PCR yang tidak diinginkan (Kalendar, 2025). Primer yang paling sesuai untuk mendeteksi gen 16S rRNA pada *E. coli* adalah Primer Pair 2 yang menghasilkan produk PCR sepanjang 553 bp. Pasangan ini terdiri atas primer forward 5'-CCTTAGGGCCTCTTGCCATC-3' dan primer reverse 5'-GAGCGTCAGTCTTCGTCCAG-3', masing-masing sepanjang 20 nukleotida. Panjang produk PCR sebesar 553 bp berada dalam rentang ideal 100–1000 bp dan terlihat jelas pada elektroforesis gel agarosa 2%. Hasil ini konsisten dengan analisis silang menggunakan perangkat lunak Gel Analyzer 23.1.1, di mana produk PCR muncul sebagai pita yang sesuai dengan ukuran DNA ladder pada kisaran 100–1500 bp, sehingga mengonfirmasi panjang produk yang akurat.

Tabel 3. Kandidat Primer yang Dirancang Menggunakan NCBI Software

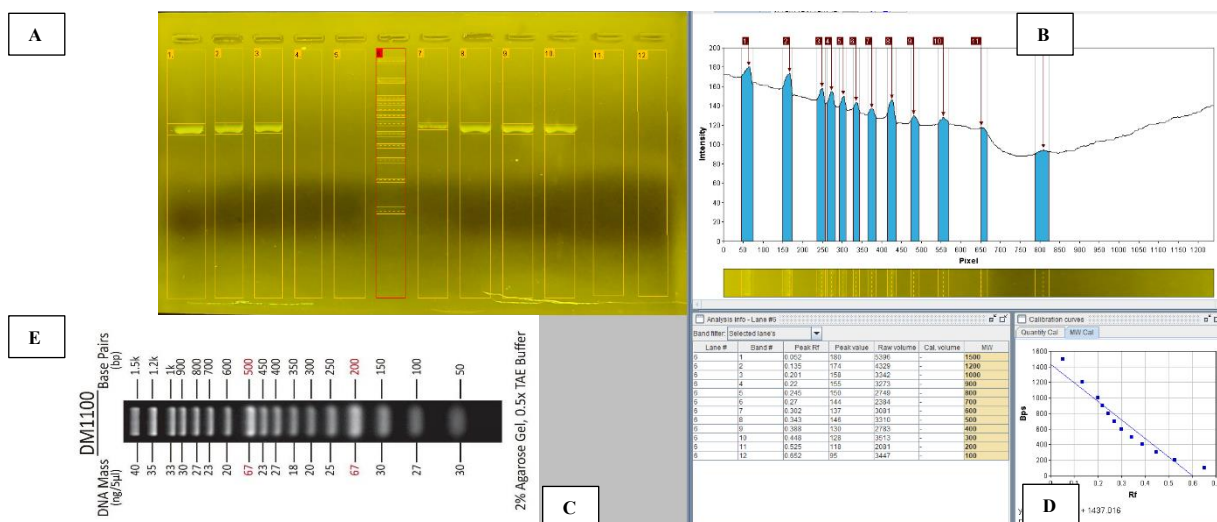
No	Primer	Product Length (bp)
1	F CTTGCTGCTTTGCTGACGAG R CGAGACTCAAGCTTGCCAGT	579
2	F CCTTAGGGCCTCTTGCCATC R GAGCGTCAGTCTTCGTCCAG	553
3	F CAGCTTGCTGCTTTGCTGAC R CTTAACAAACCGCCTGCGTG	518
4	F GCACAAAGAGGGGGACCTTA R GCATTTACCGCTACACCTG	509
5	F GAACGGTAACAGGAAGCAGC R TGCGCTTTACGCCAGTAAT	516
6	F CAAGCACAAAGAGGGGGACC R CTGAGCGTCAGTCTTCGTCC	573
7	F ACCTTAGGGCCTCTTGCCAT R CCTGAGCGTCAGTCTTCGTC	557
8	F TTGCTGCTTTGCTGACGAGT R ATGCAGTTCCAGGTTGAGC	553
9	F AGCACAAAGAGGGGGACCTT R CTTCGCCACCGGTATTCCTC	541
10	F AAGCACAAAGAGGGGGACCT R TCTCTACGCATTTACCGCT	518

Tabel 4. Parameter Kandidat Primer

No. Primer	Panjang Oligonukleotida	Tm (°C)	%GC	Dimer pada ujung 3'	Self Complementary
1	20	60,11	55	1	3
	20	60,32	55	2	8
2	20	60,18	60	0	5
	20	60,46	60	1	3
3	20	60,66	55	1	6
	20	60,39	55	2	4
4	20	59,30	55	2	3
	20	59,55	55	2	2
5	20	59,20	55	3	3
	20	60,39	50	2	5
6	20	60,90	60	3	3
	20	60,46	60	0	6
7	20	60,92	55	2	5
	20	60,46	60	1	6
8	20	60,82	50	2	3
	20	60,61	55	2	4
9	20	61,07	55	1	3
	20	60,53	60	0	6
10	20	61,07	55	2	3
	20	59,47	50	2	2



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR pada agarosa 2%. Lajur 1, sampel *Escherichia coli* ; Lajur 2,sampel *Escherichia coli*; Lajur 3,sampel *Escherichia coli*; Lajur 4,sampel *Pseudomonas aeruginosa*; Lajur 5,sampel *Pseudomonas aeruginosa*; Lajur 6, DNA marker; Lajur 7,sampel *Escherichia coli*; Lajur 8,sampel*Escherichia coli*; Lajur 9,sampel *Escherichia coli*; Lajur 10,sampel *Escherichia coli*; Lajur 11,sampel *Pseudomonas aeruginosa*; Lajur 12,sampel *Pseudomonas aeruginosa*.



Gambar 3. Visualisasi menggunakan perangkat lunak Gel Analyzer 23.1.1. (A) Hasil elektroforesis PCR dengan kotak merah menunjukkan DNA ladder. (B) Kurva intensitas dan nilai piksel dari hasil PCR. (C) Tabel data hasil DNA PCR. (D) Kurva kalibrasi. (E) DNA ladder.

PEMBAHASAN

Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% dan divisualisasikan dengan UV transilluminator. DNA ladder digunakan untuk menentukan ukuran fragmen, yang mengonfirmasi panjang yang diharapkan sekitar 553 bp untuk *E. coli*, dengan posisi pita berada pada kisaran 500–600 bp pada DNA ladder. Hasil ini menunjukkan bahwa primer efektif dan sesuai untuk mengamplifikasi gen target, yaitu gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA sangat terkonservasi pada *E. coli* dan banyak digunakan untuk identifikasi bakteri karena memiliki daerah variabel yang spesifik spesies.

Sebaliknya, tidak ditemukan produk amplifikasi pada *P. aeruginosa*, yang menunjukkan tingginya spesifisitas primer terhadap gen 16S rRNA *E. coli* (Ehtisham et al., 2016). *P. aeruginosa* digunakan sebagai kontrol spesifisitas dan hasil ini mengonfirmasi bahwa primer hanya mengamplifikasi gen 16S rRNA *Escherichia coli*, yang sangat penting untuk deteksi dan identifikasi yang akurat. Hal ini menunjukkan bahwa primer mampu membedakan kedua spesies dengan efektif melalui penargetan urutan gen 16S rRNA yang unik pada *E. coli*.

Proses pemurnian ganda menggunakan Maestro NanoPro menghasilkan DNA dari *Escherichia coli* dengan tingkat kemurnian tinggi dan konsentrasi yang cukup untuk amplifikasi menggunakan PowerPol 2X PCR Mix. Gen 16S rRNA berhasil diamplifikasi berkat DNA berkualitas tinggi yang diperoleh. Meskipun tahap pemurnian kedua sedikit menurunkan konsentrasi DNA, hasil akhirnya tetap berada dalam rentang optimal yang dibutuhkan untuk aktivitas polimerase yang efektif. Struktur dinding sel *Escherichia coli* yang lebih sederhana memfasilitasi lisis sel dan ekstraksi DNA secara efisien, sehingga memastikan DNA genomik tetap utuh untuk amplifikasi (Islam et al., 2017).

Sebaliknya, tidak ada pita DNA yang terdeteksi pada *Pseudomonas aeruginosa*, yang menunjukkan bahwa metode pemurnian ganda kurang efektif untuk spesies ini. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh struktur dinding selnya yang kompleks, yang mengandung lapisan

asam alginat dan kadar lipopolisakarida (LPS) yang tinggi, sehingga menciptakan hambatan terhadap lisis enzimatis dan menurunkan efisiensi ekstraksi. Selain itu, LPS dan polisakarida ekstraseluler mungkin bertindak sebagai inhibitor PCR, sehingga menghambat amplifikasi gen 16S rRNA pada *Pseudomonas aeruginosa* (Valentine *et al.*, 2020; Moon, Lee and Oh, 2022; Pang *et al.*, 2019).

Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian Sabat *et al.* (2000) yang menunjukkan bahwa penggunaan primer spesifik 16S rRNA pada *E. coli* menghasilkan amplifikasi tunggal dengan sensitivitas tinggi dan mampu membedakan *E. coli* dari bakteri enterik lain (Sabat *et al.*, 2000). Selain itu, studi oleh Zhang *et al.* (2020) menegaskan bahwa desain primer berbasis analisis *in silico* dapat meningkatkan spesifisitas dan efisiensi dalam amplifikasi gen 16S rRNA (Zhang *et al.*, 2020). Hasil serupa juga dilaporkan oleh Regueira-Iglesias *et al.* (2023) yang menunjukkan bahwa primer 16S rRNA yang dievaluasi secara *in silico* mampu mengidentifikasi lebih dari 98% spesies bakteri klinis dengan akurasi tinggi menggunakan pendekatan PCR dan *next-generation sequencing* (NGS) (Regueira-Iglesias *et al.*, 2023). Selain itu, studi oleh Van Der Pol *et al.* (2019) menganalisis secara *in silico* berbagai set primer 16S rRNA dan kemudian diuji eksperimental; hasil menunjukkan bahwa set primer V4 dengan clustering pada 99% identitas memberikan identifikasi spesies yang optimal pada mikrobiota vagina (Van Der Pol *et al.*, 2019).

Temuan-temuan tersebut memperkuat hasil penelitian ini bahwa kombinasi antara desain primer yang sesuai dan penerapan purifikasi DNA mampu meningkatkan keberhasilan amplifikasi serta spesifisitas PCR. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa primer memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen 16S rRNA *E. coli*, ditunjukkan dengan tidak adanya pita DNA pada *P. aeruginosa* dan fragmen berukuran tepat pada *E. coli*. Hal ini mengonfirmasi akurasi dan reliabilitas primer untuk deteksi gen 16S rRNA pada *E. coli*, sehingga menjadikannya sesuai untuk identifikasi spesifik dan pembedaan dari *P. aeruginosa*.

Namun demikian, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Validasi hasil PCR masih terbatas pada uji gel elektroforesis tanpa analisis sekuensing untuk konfirmasi identitas gen target. Selain itu, jumlah sampel bakteri yang digunakan masih terbatas sehingga belum merepresentasikan variasi genetik antarstrain *E. coli*. Faktor lingkungan, kondisi penyimpanan DNA, serta kemungkinan adanya inhibitor PCR juga belum dievaluasi secara mendalam. Oleh karena itu, penelitian lanjutan dengan jumlah sampel lebih besar, metode sekuensing, dan optimasi kondisi reaksi diperlukan untuk memperkuat temuan ini dan memperluas penerapannya dalam diagnostik molekuler.

SIMPULAN

Primer Pair 2 telah dirancang dan divalidasi untuk gen 16S rRNA *Escherichia coli* menggunakan NCBI Primer Blast. Amplifikasi PCR menghasilkan produk sepanjang 553 bp yang dikonfirmasi melalui elektroforesis gel agarosa 2% dan perbandingan dengan DNA ladder, dengan pita terletak pada kisaran 500–600 bp. Primer yang digunakan adalah Forward: 5'-CCTTAGGGCCTCTTGCCATC-3' dan Reverse: 5'-GAGCGTCAGTCTTCGTCCAG-3', yang dipilih berdasarkan panjang oligonukleotida, T_m, kandungan GC, posisi ikatan target, dimer ujung 3', serta self-complementarity. *Pseudomonas aeruginosa* digunakan sebagai kontrol spesifisitas dan tidak menunjukkan amplifikasi, sehingga mengonfirmasi bahwa Primer Pair 2

spesifik terhadap *Escherichia coli*. Hasil ini divalidasi lebih lanjut menggunakan perangkat lunak Gel Analyzer 23.1.1, yang memastikan akurasi dan reliabilitas metode deteksi PCR.

SARAN

Untuk meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas deteksi gen 16S rRNA pada *Escherichia coli*, penelitian lebih lanjut perlu mencakup spesies bakteri tambahan sebagai kontrol, mengoptimalkan kondisi PCR, menggunakan metode ekstraksi DNA alternatif untuk spesies yang lebih kompleks, mengintegrasikan Gel Analyzer dengan perangkat kuantitatif pelengkap, serta mempublikasikan sekuens primer guna mendukung reproduibilitas dan validasi.

REFERENSI

- Branquinho, M.R., Ferreira, R.T.B., Cardarelli-Leite, P., 2012. Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. *Food Sci. Technol.* 32, 112–118. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000012>
- Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., Nissar, S., 2016. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian J. Contemp. Dent.* 4, 30. <https://doi.org/10.5958/2320-5962.2016.00030.9>
- Elfadadny, A., Ragab, R.F., AlHarbi, M., Badshah, F., Ibáñez-Arancibia, E., Farag, A., Hendawy, A.O., De los Ríos-Escalante, P.R., Aboubakr, M., Zakai, S.A., Nageeb, W.M., 2024. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front. Microbiol.* 15, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1374466>
- Fakih, T.M., Wijaya, S., Priani, S.E., 2021. Desain Primer Gen 12S sRNA dari DNA Mitokondria Babi (*Sus scrofa*) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. *J. Sains Farm. Klin.* 8, 316. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021>
- Fitri, L.E., Widaningrum, T., Endharti, A.T., Prabowo, M.H., Winaris, N., Nugraha, R.Y.B., 2022. Malaria diagnostic update: From conventional to advanced method. *J. Clin. Lab. Anal.* 36, 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcla.24314>
- Green, M.R., Sambrook, J., 2019. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019, 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Handoyo, D., Rudiretna, A., 2001. Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas* 9, 17–29.
- Hawkins, J.L., Uknalis, J., Oscar, T.P., Schwarz, J.G., Vimini, B., Parveen, S., 2019. The effect of previous life cycle phase on the growth kinetics, morphology, and antibiotic resistance of *Salmonella typhimurium* DT104 in brain heart infusion and ground chicken extract. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01043>
- Hidayati, N., Nurrahman, N., Fuad, H., Munandar, H., Zilda, D.S., Ernanto, A.R., Samiasih, A., Oedjijono, O., Ethica, S.N., 2021. *Bacillus tequilensis* Isolated from Fermented Intestine of *Holothuria Scabra* Produces Fibrinolytic Protease with Thrombolysis Activity. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 707. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/707/1/012008>

-
- Islam, M.S., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P.R., 2017. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines* 8. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jaybhaye, A., Deb, M., 2021. Pathogenesis of *Escherichia coli*: A Clinical Findings. *J. Pharm. Res. Int.* 33, 3185–3191. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i60b34995>
- Kalendar, R., 2025. Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 36, 102716. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102716>
- Maheshwari, N., Kumar, P., Sivaram, A., Patil, N., 2022. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert Series Editor. A Complet. Guid. to Gene Cloning From Basic to Adv. 69–78. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4>
- Moon, Y.J., Lee, S.Y., Oh, S.W., 2022. A Review of Isothermal Amplification Methods and Food-Origin Inhibitors against Detecting Food-Borne Pathogens. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11030322>
- Oechsle, C.M., Paul, T.A., Seichko, J.D., Worst, T.J., 2024. Salmon sperm DNA increases sample recovery from cotton swabs. *Forensic Sci. Int. Genet.* 69, 102996. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102996>
- Panda, B.B., Meher, A.S., Hazra, R.K., 2019. Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. *J. Parasit. Dis.* 43, 337–342. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01136-0>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., Cheng, Z., 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37, 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Paprocka, P., Durnaś, B., Mańkowska, A., Król, G., Wollny, T., Bucki, R., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cancer Patients. *Pathogens* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060679>
- Pradnyaniti, D., Wirajana, I., Yowani, S, C., 2010. Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Farm. Udayana* 124–130.
- Regueira-Iglesias, A., Vázquez-González, L., Balsa-Castro, C., Vila-Blanco, N., Blanco-Pintos, T., Tamames, J., Carreira, M.J., Tomás, I., 2023. In silico evaluation and selection of the best 16S rRNA gene primers for use in next-generation sequencing to detect oral bacteria and archaea. *Microbiome* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01481-6>
- Reshes, G., Vanounou, S., Fishov, I., Feingold, M., 2008. Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 94, 251–264. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104398>

- Sabat, G., Rose, P., Hickey, W.J., Harkin, J.M., 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 844–849. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.844-849.2000>
- Valentine, M.E., Kirby, B.D., Withers, T.R., Johnson, S.L., Long, T.E., Hao, Y., Lam, J.S., Niles, R.M., Yu, H.D., 2020. Generation of a highly attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for commercial production of alginate. *Microb. Biotechnol.* 13, 162–175. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13411>
- Van Der Pol, W.J., Kumar, R., Morrow, C.D., Blanchard, E.E., Taylor, C.M., Martin, D.H., Lefkowitz, E.J., Muzny, C.A., 2019. In Silico and Experimental Evaluation of Primer Sets for Species-Level Resolution of the Vaginal Microbiota Using 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing. *J. Infect. Dis.* 219, 305–314. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy508>
- Van Pelt-Verkuil, E., 2008. PCR Primers. *Princ. Tech. Asp. PCR Amplif.* 63–90.
- Zhang, R.Y., Zou, B., Yan, Y.W., Jeon, C.O., Li, M., Cai, M., Quan, Z.X., 2020. Design of targeted primers based on 16S rRNA sequences in meta-transcriptomic datasets and identification of a novel taxonomic group in the Asgard archaea. *BMC Microbiol.* 20, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1707-0>