

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Escherichia coli*

Taksonomi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut (6):

Kingdom : Bacteria
Divisio : Proteobacteria
Classis : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif yang bersifat fakultatif anaerob. *E. coli* termasuk bakteri enterik yang secara normal berada di usus besar manusia. Sebagian besar galur *E. coli* tidak berbahaya dan justru bersimbiosis mutualisme dengan manusia. *E. coli* dapat membantu melindungi tubuh dari infeksi bakteri lain dengan berkompetisi dan menghasilkan *colisin* yang dapat menghambat pertumbuhan patogen enterik lain seperti *Shigella* dan *Salmonella*. *E. coli* juga membantu membusukkan sisa makanan dan memproduksi vitamin K dan B yang diperlukan tubuh (3,7).

E. coli adalah kuman oportunistis. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak dan *traveller's diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus (13). *E. coli* juga dapat mencapai aliran darah dan menyebabkan sepsis (12). *E. coli* dapat melekat di sel manusia, menginvasi jaringan, berkoloni, dan melepaskan toksin. Masa inkubasi *E. coli* berlangsung 1-3 hari. Infeksi terjadi jika lebih dari 10^6 mikroorganisme masuk ke dalam tubuh.

E. coli berbentuk batang pendek dengan diameter 0,5 μm dan panjang 1-3 μm . *E. coli* dapat tumbuh pada suasana aerob maupun anaerob sehingga ia memperoleh energinya dari proses fermentasi maupun respirasi tergantung pada suasana lingkungan di mana bakteri tersebut berada, dengan suhu optimum 37°C. *E. coli* dibedakan antara galur satu dengan yang lain dengan cara serologi dari antigen somatik (O), flagellar (H), dan kapsular (K) (14).

Antigen O merupakan polisakarida spesifik spesies, sebagai komponen pembuat kompleks lipopolisakarida dari dinding sel serta berperan dalam produksi endotoksin. Antigen H merupakan antigen protein flagellar, penting dalam *serotyping* dan merupakan aspek penting dari patogenisitas.

Antigen K merupakan komponen polisakarida yang ada pada enterobakter, berperan dalam patogenisitas bakteri dalam hal mekanisme pembentukan koloni bakteri. Antigen ini menghambat fagositosis dan efek dari serum antibodi hospes. Karena adanya kapsul, antibodi tidak dapat

menghancurkan *E. coli* tersebut. Antara tiap galur *E. coli* memiliki antigen K yang berbeda.

Pili (fimbria) merupakan properti penempel bakteri pada sel manusia dan juga berfungsi sebagai alat konjugasi. Pili yang mempunyai faktor virulen tinggi biasa dikaitkan dengan antigen K yang merupakan protein, berbeda dengan antigen K kapsular polisakarida. *Colisin* merupakan *bacteriocin* yang diproduksi oleh *E. coli*, yang memiliki sifat bakterisid untuk melawan galur lain, baik dari spesies yang sama atau spesies yang memiliki kekerabatan dekat (12).

Metode identifikasi *E. coli* dalam diagnostik klinik selama ini hanya berdasarkan uji kultur bakteri pada media selektif. Sampel diinokulasi dalam media agar MacConkey yang mengandung garam empedu dan kristal violet untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme Gram positif, dan juga laktosa untuk membedakan spesies *E. coli* dari bakteri Gram negatif lainnya. Karena *E. coli* memfermentasikan laktosa maka media akan berubah menjadi asam dan menyebabkan warna merah pada koloni, sedangkan bakteri Gram negatif lain akan menghasilkan koloni yang tidak berwarna. Setelah positif *E. coli*, koloni dapat dipindahkan ke media lain seperti *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Eosin Methylene Blue* (EMB), *Salmonella-Shigella Agar* (SSA), dan media Bismuth Sulfat.

TSIA terdiri atas laktosa, sukrosa, glukosa, indikator fenol merah, FeSO_4 , serta nutrisi lain. Bakteri dimasukkan ke agar dan akan berada di bawah tabung yang tertutup tapi udara masih dapat masuk ke dalam tabung.

E. coli yang anaerob akan memfermentasi laktosa sehingga menyebabkan perubahan warna media menjadi kuning akibat terbentuknya senyawa asam hasil fermentasi laktosa yang mengubah warna indikator, terdapat gas, dan tidak ada H₂S.

Pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB), *E. coli* juga akan memberikan warna yang khas yaitu koloni berwarna gelap dan metalik pada bagian tengahnya. Pada media *Salmonella-Shigella*, *E. coli* berwarna merah-pink. *E. coli* tidak membentuk koloni pada media *Bismuth sulfat* (12,14).

Beberapa uji biokimia untuk *E. coli* yaitu: indol positif, reduksi nitrat positif, fermentasi manitol positif, fermentasi laktosa positif, H₂S negatif, sitrat negatif, *Voges-Proskauer* negatif, memproduksi gas dari glukosa, dan metil merah positif (6,12,14).

E. coli merupakan flora normal dalam usus manusia. Tetapi, ada beberapa golongan *E. coli* yang bersifat patogen. Golongan *E. coli* yang bersifat patogen tersebut adalah *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enteraggregative E. coli* (EAEC), *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), dan *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) (15,16).

B. UJI KUALITAS AIR SECARA MIKROBIOLOGIS

Secara umum, sulit dan membutuhkan banyak waktu untuk mengisolasi dan mengidentifikasi secara langsung bakteri patogen yang relevan karena jumlahnya sedikit (11). Oleh karena itu, uji kualitas air

dilakukan dengan mendeteksi adanya organisme indikator. Kriteria paling penting dari organisme indikator adalah mikroba tersebut selalu ada dalam feses manusia sehingga jika terdeteksi dalam air mengindikasikan kontaminasi feses manusia. Organisme indikator juga harus dapat bertahan hidup dalam jangka waktu yang sama dengan patogen (4).

Organisme indikator yang biasa digunakan adalah bakteri coliform. Coliform didefinisikan sebagai bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, Gram negatif, tidak membentuk endospora, berbentuk batang, memfermentasikan laktosa membentuk gas setelah ditumbuhkan di *lactose broth* selama 48 jam pada suhu 35°C (4,14).

Coliform lebih umum ditemukan di tanaman dan air, sehingga identifikasi lebih spesifik dilakukan pada coliform fekal. Coliform fekal yang dominan adalah *E. coli* karena jumlahnya di usus lebih banyak dibandingkan bakteri lain (4). Bakteri fekal disebut *thermotolerant* karena dapat tumbuh pada temperatur yang lebih tinggi (1).

Air yang layak untuk diminum seharusnya sama sekali tidak mengandung coliform (nol coliform per 100 ml) (1). Jumlah coliform total (*Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter, Escherichia*) dalam sampel air dapat ditentukan dengan perkiraan statistik yang disebut *Most Probable Number (MPN) Test* (11). Uji ini dilakukan dengan metode fermentasi *multiple-tube* yang melibatkan tiga tahap uji: *presumptive test*, uji konfirmasi, dan penyempurnaan (*completed test*).

Dalam *presumptive test*, sampel air digunakan untuk menginokulasi tabung *lactose broth*. Pada setiap tabung dimasukkan air sebanyak 10 mL; 1 mL; atau 0,1 mL. Tabung-tabung ini diinkubasi pada suhu 35°C dan diamati setelah 24 dan 48 jam untuk melihat ada tidaknya produksi gas. Produksi gas memberikan bukti dugaan adanya bakteri coliform. Dalam melakukan *presumptive test*, ahli mikrobiologi memperkirakan jumlah organisme menggunakan metode *Most Probable Number*.

Beberapa bakteri noncoliform juga memproduksi gas. Oleh karena itu, diperlukan uji tambahan untuk konfirmasi adanya coliform. Pada uji konfirmasi, sampel dengan pengenceran tertinggi yang memproduksi gas digoreskan pada agar *Eosin Methylene Blue* (EMB). EMB mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif. Coliform yang memproduksi asam, dalam suasana asam pewarna EMB diabsorpsi oleh koloni mikroorganisme. Maka setelah inkubasi 24 jam, koloni coliform berwarna gelap di bagian tengah dan mungkin juga berwarna hijau metalik. Adanya koloni seperti ini mengkonfirmasi adanya coliform.

Pada uji penyempurnaan (*completed test*), organisme dari koloni yang berwarna gelap di media EMB diinokulasikan ke dalam *lactose broth* dan agar miring. Produksi asam dan gas dalam *lactose broth* dan identifikasi mikroskopik Gram negatif, batang yang tidak membentuk spora dari agar miring memastikan hasil yang positif.

Dalam metode filter membran, 100 mL sampel air disaring melalui filter membran yang steril dengan diameter pori membran 0,45 µm. Membran ini

memerangkap bakteri di permukaannya kemudian diinkubasi pada permukaan absorben steril yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan medium pertumbuhan yang sesuai. Setelah inkubasi, terbentuk koloni pada filter dimana bakteri terperangkap selama proses filtrasi. Adanya lebih dari satu koloni per 100 mL air mengindikasikan air tidak aman untuk dikonsumsi manusia. Tes tambahan dapat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri secara lebih spesifik. Metode filter membran jauh lebih cepat dan memungkinkan volume air yang lebih besar untuk diuji daripada metode fermentasi *multiple-tube* (5). Metode ini cocok untuk air yang memiliki turbiditas rendah sehingga tidak menyumbat filter dan air yang memiliki bakteri noncoliform relatif sedikit sehingga tidak menutupi hasil uji (4).

C. 16S rRNA

Teknik yang akurat untuk identifikasi molekular bakteri adalah identifikasi terhadap gen penyandi 16S rRNA, dikenal dengan sebutan *ribotyping/riboprinting*. Identifikasi tersebut didasarkan pada tingkat kesamaan dalam sekuens gen 16S rRNA sebagai sidik jari genetik bakteri atau disebut sekuens sidik jari (2).

Gen 16S rRNA dari setiap spesies bakteri memiliki bagian yang stabil dalam sekuens dan satu sel bakteri memiliki ribuan kopi RNA (14). Gen 16S rRNA berupa polinukleotida besar (1500-2000 basa) dan merupakan bagian dari subunit kecil dari ribosom prokariot (2,22). Gen 16S rRNA bersama dengan beberapa protein kecil bergabung dalam subunit kecil ribosom (2).

Analisis terhadap gen penyandi 16S rRNA merupakan metode terpilih untuk identifikasi dan melihat filogenitas bakteri. Keuntungannya adalah RNA secara umum dimiliki oleh semua bakteri, sedikit berubah dalam waktu tertentu, merupakan unit yang konstan, dan merupakan target yang sensitif karena terdapat dalam jumlah banyak dalam sel yang aktif (2,4,12). Jika sekuens nukleotida dari gen 16S rRNA dari dua tipe organisme sangat mirip atau memiliki sedikit perbedaan basa dalam rRNA, maka kedua organisme tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat, ditinjau dari kedekatan secara evolusinya (5).

Sekuensing gen 16S rRNA dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan sekuensing secara langsung dan sekuensing dengan bantuan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode yang lebih baru, yaitu dengan teknik PCR, merupakan metode terpilih karena teknik PCR membutuhkan lebih sedikit bahan, lebih cepat, dan lebih praktis dilakukan untuk penelitian daripada sekuensing RNA secara langsung. Teknik PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi gen rRNA menggunakan primer komplemen yang diproduksi secara sintetik (2,5).

DNA atau gen rRNA di sampel air dapat diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer rRNA. Sepasang primer ini dibuat dari sekuens rRNA untuk mengamplifikasi DNA yang mengkodekan 16S rRNA (2,4). Sekuens primer ini adalah spesifik genus atau spesifik spesies, sehingga hanya akan mengamplifikasi *E. coli* (12),

DNA target spesifik yang sangat sedikit dapat diamplifikasi menggunakan PCR. PCR menggunakan DNA polymerase termotabil untuk memproduksi amplifikasi target DNA dua kali lipat dengan setiap siklus temperatur. DNA yang diekstraksi dari sampel bersama primer oligonukleotida spesifik sekuens, nukleotida, DNA polymerase termotabil, dan dapat dipanaskan mencapai 90-95°C untuk mendenaturasi dua utas DNA target. Suhu reaksi kemudian diturunkan, biasanya mencapai 45-60°C tergantung pada primer, untuk memungkinkan penempelan primer ke DNA target. Setiap primer kemudian mengalami pemanjangan oleh DNA polymerase termotabil dengan cara menambahkan nukleotida yang komplementer terhadap DNA target. Siklus ini kemudian diulangi 30-40 kali untuk mendapatkan amplifikasi segmen DNA target sebanyak 10^5 - 10^6 kali. Segmen yang diamplifikasi dapat dilihat dengan elektroforesis gel (12).

Sekuens daerah V₃ dan V₆ gen 16S rRNA dari gen 16S rRNA *strain Escherichia coli* patogen dan non patogen telah ditentukan. Primer oligonukleotida 16E1 (5'-GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC-3') di daerah V₃ serta 16E2 (5'-TTCCCGAAGGCACATTCT-3') dan 16E3 (5'-TTCCCGAAGGCACCAATC-3') di daerah V₆ dirancang sebagai primer PCR untuk deteksi spesifik *Escherichia coli*. Di daerah V₆, beberapa *strain Escherichia coli* mungkin hanya memiliki sekuens target 16E2 atau 16E3 sedangkan beberapa *strain E. coli* yang lain mungkin memiliki kedua target sekuens dalam sel yang sama. Berat molekul dari produk amplifikasi PCR adalah 584 bp (9).

D. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

PCR ditemukan pada tahun 1985 oleh Kary Mulis (18,19). PCR adalah metode *in vitro* yang digunakan untuk mengamplifikasi gen spesifik secara enzimatik. Secara umum prinsip prosedur PCR adalah denaturasi termal DNA sampel, diikuti hibridisasi primer oligonukleotida (*annealing*) ke utas DNA. Suatu DNA polymerase termostabil kemudian digunakan untuk mensintesis utas baru DNA *template* dan siklus ini kemudian diulang beberapa kali (17).

PCR adalah prosedur yang didasarkan atas kemampuan DNA *polymerase* untuk mengkopi sebuah utas DNA dengan elongasi utas komplementer yang diinisiasikan oleh sepasang primer oligonukleotida. Secara teoritis, setiap siklus reaksi menggandakan jumlah target DNA, menghasilkan tingkat amplifikasi jutaan kali lipat (16).

Dengan PCR, gen yang jumlahnya terbatas dapat menjadi target dan direplikasi. Hal ini hanya dapat dilakukan jika bagian dari sekuens yang diinginkan sudah diketahui. Sekuens ini digunakan untuk membuat oligonukleotida yang biasanya terdiri dari 20-25 basa, dikenal sebagai primer. Primer menandai titik awal sintesis DNA ketika DNA *polymerase* dan dNTP telah ditambahkan (19).

Komponen esensial untuk amplifikasi PCR adalah primer, *template* DNA, DNA *polymerase* termostabil, dan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP). Primer yang diperlukan dalam amplifikasi PCR adalah dua primer

oligonukleotida sintetik (masing-masing sekitar 20 nukleotida) yang merupakan komplementer dari daerah di atas pasangan yang merupakan sekuens DNA target. Primer menentukan bagian awal dan akhir daerah yang akan diamplifikasi.

Template DNA adalah sekuens target dari DNA sampel yang berada di antara pasangan primer, panjangnya antara 100-35000 pasang basa. DNA *polymerase* yang digunakan adalah DNA *polymerase* termostabil yang tahan terhadap pemanasan sampai lebih dari 95°C. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri dari empat macam nukleotida, yaitu dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP (20).

Sintesis masing-masing utas DNA dimulai ("*primed*") oleh utas ganda yang pendek. Bekerja dari primer ini, enzim *polymerase* menambahkan nukleotida-nukleotida yang komplementer terhadap *template* DNA, memanjangkan daerah utas ganda. Pertama, sepasang primer DNA oligonukleotida membatasi daerah target yang akan diamplifikasi. Primer dirancang untuk melekat (*anneal*) ke sekuens DNA komplementer pada ujung 5' dari tiap utas molekul DNA. Tiap primer dicampur dalam jumlah berlebih dengan DNA sampel yang mengandung sekuens target, bersama dengan DNA *polymerase*, kofaktor Magnesium (Mg^{++}), dan empat deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) (18).

Selama fase sintesis dari siklus pertama, DNA yang baru disintesis dari masing-masing primer dipanjangkan melewati ujung sekuens yang komplementer terhadap primer kedua. Utas baru ini membentuk "*long*

template” yang digunakan untuk siklus kedua (26). Sehingga, akan dihasilkan akumulasi eksponensial dari fragmen target DNA dengan jumlah 2^n , dimana n menunjukkan jumlah siklus amplifikasi yang dilakukan (1,21).

PCR adalah prosedur yang efektif untuk menghasilkan sejumlah besar sekuens DNA spesifik secara *in vitro*. Amplifikasi sekuens DNA spesifik ini dicapai dengan proses siklus yang terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan elongasi (16,18,19,20).

Langkah pertama sistem amplifikasi PCR adalah denaturasi termal sampel DNA dengan menaikkan temperatur dalam *tube* reaksi sampai 95°C . Temperatur dipertahankan selama sekitar satu menit (20). Pemanasan sampai mendekati titik didih mendenaturasi DNA target dan membuat sebuah set *template* utas tunggal. Pemanasan meningkatkan energi tersebut lebih besar dari energi yang dibutuhkan untuk mempertahankan ikatan hidrogen di antara pasangan basa, dan DNA utas ganda terpisah menjadi utas tunggal (18).

Pada tahap *annealing*, penurunan suhu secara bertahap sampai sekitar $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$ akan melekatkan primer ke sekuens komplementernya pada *template* utas tunggal. Temperatur *annealing* yang optimum bervariasi tergantung pada proporsi pasangan basa AT dan GC pada sekuens primer. Karena primer yang ditambahkan berlebih dan pendek, maka primer akan melekat pada sekuens target yang panjang sebelum dua utas asli melekat

kembali (18). Temperatur optimum mendekati temperatur leleh (T_m), biasanya dihitung dengan rumus (19):

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Pada tahap elongasi, pemanasan sampai 72°C merupakan temperatur optimum DNA *polymerase* untuk memanjangkan primer oligonukleotida. Enzim *polymerase* mensintesis utas kedua yang komplementer terhadap *template*. Sintesis DNA diinisiasi pada ujung 3'OH dari tiap primer (20). Tidak seperti protein yang lain, *Taq polymerase* tidak dirusak oleh proses denaturasi pada suhu tinggi, sehingga reaksi dapat diulang tanpa menambah enzim *polymerase* yang baru pada tiap siklus (19).

Amplifikasi DNA dalam setiap penelitian yang baru membutuhkan optimasi karena tidak ada protokol yang sesuai untuk semua kondisi. Masalah yang sering timbul antara lain: ampikon yang tidak dapat terdeteksi atau jumlah ampikon yang dihasilkan terlalu sedikit, pita yang dihasilkan pada elektroforesis gel agarosa tidak spesifik karena masalah *mispriming* (kesalahan pemasukan primer) atau *misextension* (kesalahan pemanjangan primer).

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam optimasi PCR adalah konsentrasi enzim, konsentrasi Magnesium, komponen reaksi lain, pelekatan primer (*primer annealing*), pemanjangan primer (*primer extension*), waktu dan temperatur denaturasi, jumlah siklus, dan primer.

Kisaran konsentrasi enzim DNA *Taq polymerase* yang direkomendasikan adalah antara 1-2,5 unit per 100 μ l reaksi jika parameter lainnya optimum. Kebutuhan enzim dapat bervariasi tergantung dari target DNA atau primer yang digunakan. Bila konsentrasi enzim terlalu tinggi, maka akan menyebabkan akumulasi ampikon yang tidak spesifik. Sehingga bila konsentrasi enzim terlalu rendah, maka ampikon yang dihasilkan akan sedikit.

Konsentrasi Magnesium dapat mempengaruhi proses pelekatan primer; suhu denaturasi rantai DNA, baik pada *template* DNA ataupun ampikon; spesifisitas ampikon; serta aktivitas dan ketepatan enzim. *Taq polymerase* membutuhkan Magnesium untuk aktivitasnya. Magnesium bebas dibutuhkan oleh enzim ini agar dapat berikatan dengan *template* DNA, primer, dan dNTP.

Konsentrasi Magnesium pada proses PCR sebaiknya antara 0,5 sampai 2,5 mM di atas konsentrasi total dNTP. Konsentrasi ion Magnesium yang rendah dapat menyebabkan reaksi menjadi kurang efisien, sedangkan konsentrasinya yang tinggi dapat menyebabkan spesifisitas menurun. Maka, konsentrasi optimal Magnesium harus ditentukan secara empiris berdasarkan primer dan *template* DNA yang digunakan. Adanya EDTA atau pengkhelat lainnya dalam larutan induk primer atau *template* DNA dapat mengganggu konsentrasi optimum Magnesium.

Jumlah dapar yang direkomendasikan untuk PCR adalah 10-50 mM Tris HCl (antara pH 8,3-8,8). KCl dengan konsentrasi hingga 50 mM dapat

ditambahkan ke dalam campuran pereaksi untuk membantu proses pelekatan primer. NaCl dengan konsentrasi di atas 50 mM atau KCl dengan konsentrasi di atas 50 mM dapat menghambat aktivitas enzim DNA *Taq Polymerase*.

Penyebab kegagalan PCR yang biasanya terjadi adalah proses denaturasi DNA target dan atau amplicon yang tidak lengkap. Kondisi denaturasi yang umum digunakan adalah 95°C selama 30 detik atau 97°C selama 25 detik. Namun, penggunaan temperatur yang lebih tinggi mungkin akan lebih sesuai, terutama jika target banyak mengandung pasangan basa G-C.

Proses denaturasi yang tidak lengkap dapat menyebabkan pengurangan jumlah amplicon. Sedangkan, tahap denaturasi yang menggunakan temperatur terlalu tinggi dan atau waktu yang terlalu lama akan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Waktu paruh dari aktivitas *Taq polymerase* yaitu lebih besar dari 2 jam pada suhu 92,5°C, 4 menit pada suhu 95°C, dan 5 menit pada suhu 97,5°C.

Temperatur dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pelekatan primer bergantung pada komposisi dan panjang basa yang akan diamplifikasi serta konsentrasi primer. Temperatur *annealing* yang digunakan adalah 5°C di bawah titik lebur primer.

Temperatur *annealing* antara 55-72°C umumnya memberikan hasil yang terbaik. Pada konsentrasi primer sebesar 0,2 µM, proses pelekatan primer hanya memerlukan waktu beberapa detik. Peningkatan temperatur

annealing akan meningkatkan seleksi terhadap primer *annealing* yang salah serta mengurangi meluasnya nukleotida yang tidak tepat pada ujung 3' dari primer. Maka, temperatur *annealing* yang meningkat, khususnya pada beberapa siklus awal, akan meningkatkan spesifisitas.

Waktu pemanjangan primer (*extension*) bergantung pada panjang dan konsentrasi sekuens target serta temperatur yang digunakan. Waktu pemanjangan selama 1 menit pada suhu 72°C dianggap cukup untuk menghasilkan ampikon dengan panjang hingga 2 kb. Tetapi, waktu pemanjangan yang lebih lama mungkin berguna pada tahap awal siklus bila konsentrasi substrat sangat rendah, serta pada tahap akhir siklus bila konsentrasi ampikon melebihi konsentrasi enzim.

Jumlah siklus optimum terutama tergantung pada konsentrasi awal DNA target yang akan diampifikasi. Kesalahan yang sering terjadi adalah merencanakan siklus yang berlebihan. Jumlah siklus yang terlalu banyak akan meningkatkan jumlah dan kompleksitas ampikon yang tidak spesifik. Namun, bila jumlah siklus yang digunakan terlalu sedikit, maka akan menghasilkan ampikon yang sedikit pula. Umumnya siklus PCR dilakukan sebanyak 20-30 kali.

Konsentrasi primer optimal umumnya antara 0,1-0,5 μM . Konsentrasi primer yang lebih tinggi dapat menyebabkan *mispriming* (kesalahan pemasukan primer) dan akumulasi ampikon yang tidak spesifik. Panjang nukleotida yang digunakan sebagai primer umumnya 18-28 nukleotida dan mempunyai kandungan G-C sebesar 50-60%. Penggunaan rancangan primer

yang mempunyai nukleotida G dan C secara berurutan sebanyak tiga kali atau lebih pada ujung 3' sebaiknya dihindari karena dapat menyebabkan *mispriming*, terutama pada daerah yang kaya akan sekuen G-C (22).

E. ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA

Elektroforesis gel adalah teknik yang umum digunakan untuk menetapkan protein atau asam nukleat. Secara umum, suatu sampel dari satu makromolekul khusus (protein, DNA, atau RNA) ditempatkan dalam sebuah sumur pada atau dekat suatu matriks gel. Komposisi sebuah elektroforesis gel adalah sebuah jaring terbuka dari utas-utas linear yang saling berhubungan. Gel berperan sebagai papan tipis dengan sejumlah sumur sampel. Setelah sumur gel diisi dengan sampel, medan listrik dialirkan pada gel, dan makromolekul bermuatan dengan ukuran yang sama dijalankan ke arah anoda melalui gel sebagai material pita tunggal yang tidak terlihat. Jarak sebuah pita bergerak ke dalam gel tergantung dari massa makromolekul dan ukuran pori gel. Makromolekul yang lebih kecil akan berjalan lebih jauh daripada makromolekul yang lebih besar.

Proses elektroforesis gel dimonitor dengan mengamati migrasi pewarna tampak melalui gel. Pewarna tersebut adalah campuran dengan bobot molekul rendah dan bermuatan, yang dimasukkan ke dalam tiap sumur sampel di awal proses. Ketika pewarna mencapai ujung gel, proses dihentikan. Pita-pita dalam tiap lajur di bawah setiap sumur divisualisasikan dengan mewarnai gel dengan pewarna yang spesifik untuk protein, DNA,

atau RNA tersebut. Pita tunggal diamati ketika terdapat materi dalam pita yang cukup untuk mengikat pewarna sehingga pita dapat terlihat dan makromolekul tunggal dari sampel memiliki ukuran yang jelas berbeda.

Agarosa yang merupakan polisakarida dari rumput laut digunakan secara rutin sebagai matriks gel untuk pemisahan elektroforesis dari molekul asam nukleat ukuran sedang, misalnya rantai DNA antara 600-1000 pasang basa (20).

Asam nukleat adalah asam dan bermuatan negatif sehingga bermigrasi ke kutub positif dalam suatu medan listrik. Elektroforesis gel agarosa adalah prosedur standar untuk memisahkan fragmen DNA dengan ukuran bervariasi. Agarosa ditambahkan pada dapar elektroforesis kemudian dilarutkan dengan cara dipanaskan. Adanya banyak kelompok hidroksil (R-OH) memungkinkan jembatan hidrogen terbentuk, yang menguatkan matriks gel berpori besar. Gel agarosa diletakkan dengan posisi horisontal dan tertutup oleh dapar untuk mencegahnya mengering.

Kecepatan fragmen DNA bermigrasi melalui gel agarosa dalam medan listrik tergantung pada ukuran fragmen DNA. Selain itu juga tergantung pada sifat dapar yang digunakan, konsentrasi gel agarosa, kekuatan aliran listrik, dan konformasi molekul DNA. DNA menjadi tampak dengan pewarnaan, misalnya dengan etidium bromida, dimana DNA tampak sebagai pita berwarna pink di bawah sinar UV (19).