

## Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR

### (Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design)

Muh. Aris<sup>1)</sup>, Sukenda<sup>2)</sup>, Enang Harris<sup>2)</sup>, M. Fatuhcri Sukadi<sup>3)</sup>,  
Munti Yuhana<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dosen/Staf Pengajar di Program Studi Budidaya Perairan FPIK-UNKHAIR Ternate, Maluku Utara

<sup>2)</sup> Dosen/Staf Pengajar di Departemen Budidaya Perairan FIKP- IPB, Bogor

<sup>3)</sup> Peneliti di Pusat Riset Perikanan Budidaya (PRPB-DKP RI) Jakarta

#### Abstract

Management of healthy seaweed aquaculture and control of ice ice disease are important component in seaweed production. To support the integrated prevention of ice ice disease, information about genetic variation of bacterial pathogen and the availability of fast and accurate detection are required. This study aimed to identify bacterial pathogen based on gene sequence analysis 16S-rRNA, construction of specific PCR primer from gene sequent analysis 16S-rRNA from bacteria that had the highest pathogenicity. Gene 16S rRNA of bacteria that had the highest pathogenicity was amplified with universal primer PCR domain forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') and reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). DNA Sequence obtained was compared to data base *European Bioinformatics Institute* (EBI) BLASTN. Construction and feasibility analysis of primer pair was done using primer 3 program. Two specific primer PCR were successfully constructed namely aSEFM-F (5- CAGCCACACTGGAAGTGA-3) and aSEFM-R(5 TTAGCCGGTGCTTCTTCTGT -3). Both primer reacted optimum at 60°C and produced 201 bp amplicon.

*Keywords: pathogenicity, gene 16S-rRNA, PCR, primer, specific*

#### PENDAHULUAN

Penyakit *ice-ice* dominan menyerang rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang dibudidayakan dengan gejala awal klinis yang ditimbulkan seperti produksi lendir meningkat, permukaan *thallus* kasar, *thallus* layu, terbentuknya bintik putih, dan pemutihan ujung *thallus*. Serangan penyakit *ice-ice* yang lebih parah dapat menyebabkan *thallus* menjadi keropos dan akhirnya *thallus* yang terinfeksi menjadi patah (rontok).

Penyebaran penyakit *ice-ice* pada lokasi budidaya rumput laut *Kappaphycus alvarezii* terjadi di seluruh pusat pengembangan produksi rumput laut baik

secara global maupun di wilayah pengembangan produksi rumput laut di Indonesia. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa penyebaran penyakit *ice-ice* disebabkan oleh serangan bakteri patogen.

Pengelolaan budidaya rumput laut yang sehat dan bebas penyakit *ice-ice* merupakan komponen penting dalam peningkatan produksi rumput laut, sehingga diperlukan teknik deteksi cepat dan akurat. Selama ini identifikasi dan deteksi bakteri patogen dilakukan pengamatan berdasarkan gejala klinis dan riwayat kejadian penyakit di lokasi budidaya, serta karakteristik morfologi dan fisiologi. Walaupun metode ini sangat

penting sebagai studi awal, namun cara ini kurang dapat menentukan hubungan filogenetis dan ekspresinya sangat dipengaruhi oleh lingkungan (Suwanto 1994). Untuk mendukung pengendalian terpadu penyakit *ice-ice* pada budidaya rumput laut diperlukan informasi variasi genetik dari suatu bakteri patogen dan penyediaan identifikasi dan deteksi secara cepat, akurat dengan kepekaan tinggi.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis deteksi bakteri patogen dengan menggunakan teknik PCR. Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA. Penggunaan 16S-rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekuler universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekuler berbasis PCR ialah pemilihan primer yang tepat (Rychlic 1995). Primer PCR merupakan oligonukleotida yang berperan sebagai inisiasi amplifikasi molekul DNA. Keberadaan primer PCR tersebut, maka gen target akan teramplifikasi sepanjang reaksi PCR berlangsung. Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan langkah terbaik untuk kepentingan deteksi bakteri patogen karena dapat menghasilkan penentuan secara cepat keberadaan gen target, cukup sensitif dan mudah digunakan dalam kegiatan rutin.

Untuk merancang primer spesifik tersebut diperlukan data sekuen gen yang menyandikan protein sejenis dengan fragmen yang akan diamplifikasi melalui PCR. Namun kajian spesifik kearah analisis gen bakteri patogen dari *thallus* rumput laut yang terinfeksi penyakit *ice-ice* belum dilakukan. Berdasarkan hal tersebut di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang pemanfaatan sekuen gen 16S rRNA untuk mendesain primer spesifik PCR dalam deteksi cepat dan akurat.

Kajian yang dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri patogen

berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S-rRNA, mendesain primer PCR spesifik dari sekuen gen 16S-rRNA dari bakteri yang memiliki tingkat patogenitas tertinggi. Penelitian ini diharapkan dapat menentukan strain bakteri patogen penyebab penyakit *ice-ice* dan menghasilkan suatu primer spesifik PCR untuk mendeteksi bakteri patogen penyebab penyakit *ice-ice* pada rumput laut.

## BAHAN DAN METODE

### Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri secara Molekuler

Identifikasi isolat bakteri yang memberikan tingkat patogenitas tertinggi dilakukan berdasarkan hasil sekuensing gen 16S-rRNA (Marchesi *et al.* 1998). Sekuensing gen 16S-rRNA terdiri dari tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR (Suwanto 2002), dan sekuensing dengan mesin *Sequenser*.

### Ekstraksi DNA

Bakteri patogen yang mempunyai patogenitas tertinggi ditumbuhkan dalam media SWC Broth. Kultur diinkubasi dalam *shaker water bath* pada suhu 28-29°C, 160 rpm selama 24 jam. Sel bakteri dipanen dengan mengambil 1,5 ml suspensi biakan bakteri lalu dimasukkan ke dalam eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit, selanjutnya supernatan dibuang. Tahap ini diulang sebanyak tiga kali. Pellet bakteri yang terbentuk diresuspensi dengan 1 ml buffer TE 1X dan disentrifugasi 6000 rpm selama 2 menit. Setelah disentrifugasi supernatan yang ada dibuang.

Pellet yang tertinggal diresuspensi dengan 500 µl buffer TE 1X, selanjutnya ditambahkan 100 µl SDS 10% dan 10 µl proteinase-K lalu dibolak balik perlahan-lahan hingga tercampur. Selanjutnya ditambahkan 100 µl 5 M NaCl dan 100 µl 10% CTAB/NaCl yang telah dihangatkan terlebih dahulu (65 °C) selanjutnya

diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65 °C. Kemudian ditambahkan 500 µl campuran

phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) lalu divortex hingga tercampur. Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.

Cairan yang terbentuk yang berada pada lapisan teratas dipindahkan ke dalam eppendorf yang lain lalu ditambahkan 0,6 volume isopropanol dingin. Tabung eppendorf dibolak balik secara perlahan supaya tercampur selanjutnya selama 20 menit disimpan pada suhu -20 °C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan maksimal selama 5 menit pada suhu -4°C, supernatan yang ada dibuang. Selanjutnya ditambahkan 1 ml etanol 70% dingin lalu disentrifugasi lagi pada kecepatan maksimum selama 2 menit. Supernatan dibuang kembali, lalu disimpan pada suhu ruang hingga etanol menguap habis. Sebelum disimpan DNA ditambahkan dengan *elution buffer* atau aquabidest steril serta dilakukan pengecekan dengan elektroforesis.

### Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *et al.* 1998). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 94 °C, 2 menit; tahap denaturasi 92 °C, 30 detik; tahap annealing 55 °C, 30 detik, tahap elongasi 72 °C selama 1 menit. Proses PCR terdiri dari 30 siklus. Selanjutnya *post PCR* pada suhu 75 °C selama 20 menit dan tahap *stop PCR* pada suhu 4 °C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis

### Elektroforesis

Gel elektroforesis disiapkan dengan 0,8 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x tris-

asetat EDTA (TAE):1 l dH<sub>2</sub>O, 242 gr Tris-basa, 37,2 gr Na<sub>2</sub>EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Pada waktu elektroforesis diberikan suatu marker atau penanda molekul DNA. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 30-40 Volt dan 28 – 29 mA dan diakhiri setelah bromofenol sampai tepi bawah gel.

### Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA

Sekuensing dilakukan dengan piranti *Automated DNA Sequencer* ABI PRISM 377 (Perkin Elmer Biosystem, USA). *Cycle sequencing DNA template* dilakukan menggunakan kit *BigDye® Ready Reaction Mix* (Perkin Elmer Biosystem, USA). Campuran *cycle sequencing* terdiri atas 1 µl (300-500 ng) DNA template, 3,2 pmol primer, 1 µl DMSO, 6 µl *BigDye® Ready Reaction Mix*, dan *nuclease free water* untuk menggenapkan volume menjadi 20 µl. Proses *cycle sequencing* dilakukan pada mesin *sequencer* dengan kondisi sebagai berikut: pre-PCR pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* atau pelekatan primer (50°C, 30 detik), elongasi atau pemanjangan primer (72°C, 2 menit), dan *post-PCR* (72°C, 7 menit) dengan jumlah siklus sebanyak 25 kali. Hasil *cycle sequencing* tersebut selanjutnya dimurnikan dengan metode pengendapan etanol dan natrium asetat (Sambrook dan Russell 2001). Pada metode pemurnian ini campuran hasil *cycle sequencing* dimasukkan dalam tabung Eppendorf yang berisi 50 µl 95% (v/v) etanol dan 2 µl 3M natrium asetat pH 4.6 lalu divorteks. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, campuran disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 10000 rpm. Dengan hati-hati supernatan dibuang sampai habis menggunakan pipet mikro. Pelet yang tertinggal dicuci dua kali

dengan 70% (v/v) etanol. Untuk menghilangkan sisa-sisa etanol, pelet divakum selama 10 menit. Pelet yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dengan *loading buffer* dan siap dilarikan pada gel sekuensing. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen data base *European Bioinformatics Institute* (EBI) BLASTIN 2.0 atau FASTA3 pada situs <http://www.ebi.ac.uk>.

### Perancangan Primer Spesifik

Data sekuen bakteri spesifik didapatkan dari isolat bakteri yang mempunyai tingkat patogenisitas tertinggi. Terhadap hasil sekuen tersebut dilakukan perancangan primer. Perancangan dan analisis kelayakan pasangan primer yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan program Primer 3 pada situs <http://www.justbio.com>. Primer hasil rancangan dipesan ke perusahaan Research Biolabs Singapura.

### Optimalisasi Kondisi Suhu Annealing PCR

Setelah oligonukleotida primer diperoleh, hal pertama yang dilakukan adalah menentukan kondisi optimum PCR untuk primer spesifik khususnya terhadap suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang diuji adalah 54°C, 56 °C, 58 °C, 60°C, 62 °C sedangkan suhu reaksi lainnya mengikuti prosedur.

Untuk penentuan kondisi optimum PCR tersebut, setiap reaksi PCR digunakan sampel positif berupa primer bakteri patogen, kontrol negatif berupa aquabides dan reaksi tanpa menggunakan primer. Suhu reaksi PCR yang memperlihatkan pita yang jelas dan spesifik pada ukuran 201 bp pada kontrol positif dan sampel, ditetapkan sebagai kondisi optimum PCR, dan digunakan untuk reaksi PCR selanjutnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi ini membutuhkan primer spesifik (sekuen oligonukelotida

khusus) untuk daerah tersebut. Primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida dan dirancang berdasarkan daerah konservatif dalam genom tersebut. Makin panjang primer, makin spesifik daerah yang diamplifikasi. Jika suatu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam genom kelompok tersebut.

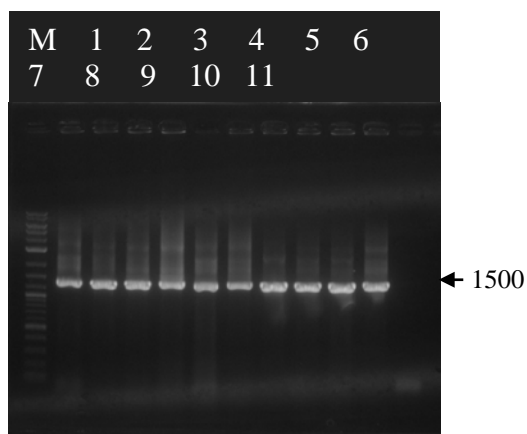
Beberapa faktor seperti konsentrasi DNA, sebagai contoh, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridisasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik. Keberhasilan teknik ini lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi ini menyangkut suhu *annealing* DNA dalam mesin PCR.

Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu leleh. Secara umum suhu leleh ( $T_m$ ) dihitung dengan rumus  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ\text{C}$  (Rybicky and Purver 1996).

Berikut ini disajikan contoh hasil amplifikasi gen 16S-rRNA pada gel

elektroforesis dari bakteri dengan primer domain bakteri forward 63f (5'-CAG GCC TAA CACATG CAA GTC) dan reverse 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC) (Marchesi *et al.* 1998).

Pemilihan DNA ribosom untuk tujuan identifikasi organisme didasarkan pada: Secara fungsional dan evolusioner memiliki sifat homolog dari berbagai organisme yang berbeda, molekul purba dengan struktur dan sekuen nukelotida sangat konservatif, sangat banyak di dalam sel, cukup besar untuk memungkinkan uji statistik perbedaan-perbedaannya satu sama lain. Hasil elektroforesis gel amplifikasi gen 16S-rRNA disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1 Hasil elektroforesis gel amplifikasi gen 16S-rRNA. M: Marker 1 : PNG K, 2 : *Vibrio alginolyticus* PNGK 1, 3 : PNGK 2, 4 : PNG K3, 5 : PNG H1, 6 : PNG H2, 7 : PRB 4, 8 : PRB 5, 9 : PRB 6, 10 : PRB7, 11 : Kontrol Negatif

#### Sekuen Gen 16S-rRNA Sampel Bakteri *Vibrio alginolyticus* PNGK 1

GACCTTCGGGACGATACGGCGTCGAGCG  
GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATT  
GCCCTGATGTGGGGATAACCATTGGAAAC  
GATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGC  
CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGT  
CAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGA  
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC

ACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA  
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC  
GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA  
AGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGTCGT  
TAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGACA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGT  
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATG  
CAGGTGGTTTGTAAAGTCAATGTGAAAGCC  
CGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAA  
CTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGG  
TAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGG  
CGCCCCCTGGACAATACTGACCTCAATGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
ACCTGGTAGTCCCCCGTAAACGATGTCTAC  
TTGGAGAGCGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCG  
TGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGAC  
CGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA  
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC  
AACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT  
CCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC  
CTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATG  
GCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA  
TCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAA  
CTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA  
TGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCAAC  
TTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTG  
CGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC  
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC  
GTGGATCAGAATGCCACGGGAAGCCC

Sekuensing merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi suatu gen. Identitas suatu gen yang telah diketahui sekuennya dapat ditentukan dengan membandingkan dengan data sekuen yang



661  
TGGACAATACTGACCTCAATGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAG

721  
TCCCCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGAGCGGAG  
GTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCG

781  
GAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGA

841  
ATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAA

901  
CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCA  
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT

961  
CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG  
TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC

1021  
GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGC  
GAGTAATGTGCGGAACTCCAGGGAGA

1081  
CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGA  
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG

1141  
TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAG  
AGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGC

1201  
GAATCCCAAAAAGTGCGTTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG

1261  
GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAAATGCCACGG  
GAAGCCC

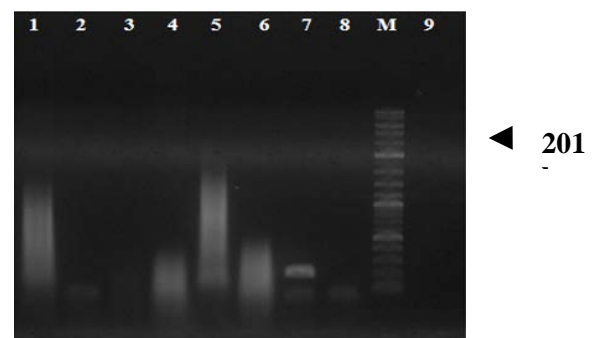
Gambar 2 Posisi primer aSEFM-F dan aSEFM-R pada sekuen DNA bakteri *Vibrio alginolyticus* PNGK 1.

Analisis kelayakan primer menggunakan program *Oligocalculator Properties* ([www.basic.nwu.edu/biotools/oligocal.html](http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocal.html)) menunjukkan kedua primer tersebut memiliki suhu pelekatan yang sama, tidak terdapat struktur jepit rambut (*loop hairpin*) dan struktur *dimer*. Analisis primer perlu dilakukan untuk menguji validitas pasangan primer yang dipilih

sehingga tidak menimbulkan masalah saat PCR, seperti banyaknya pita-pita non spesifik.

### Kondisi Optimum PCR dengan Primer aSEFM-F dan aSEFM-R

Setelah oligonukleotida primer diperoleh maka hal utama yang dilakukan adalah mengetahui kondisi optimum reaksi PCR yang melibatkan primer tersebut. Setelah diuji beberapa kondisi suhu *annealing*, diperoleh suhu *annealing* 60 °C yang menghasilkan pita spesifik 201 bp secara jelas pada kontrol positif dan sampel *Vibrio alginolyticus* PNGK 1 (Gambar 3). Oleh karena itu untuk reaksi selanjutnya digunakan kondisi running PCR adalah: *Pra* denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, *annealing* primer pada suhu 60 °C selama 30 detik, sintesis 72 °C selama 2 menit, post PCR pada suhu 72 °C selama 7 menit dan reaksi PCR dihentikan pada suhu 4 °C. Jumlah siklus yang dilakukan sebanyak 25 kali.



Gambar 3 Hasil optimasi suhu annealing reaksi PCR dengan primer spesifik pada suhu 60 °C. M : Marker 100 bp, 1: *Pseudomonas cepacia*, 2: *Pseudomonas diminuta*, 3: *Plesiomonas shigelloides* 4: *Flavobacterium meningosepticum* 5-6 dan 8: *Vibrio* spp, 7: *Vibrio alginolyticus* PNGK 1 9 : Kontrol negatif.

Secara garis besar PCR terdiri dari tiga langkah yang dilakukan secara bersamaan yaitu: (1) denaturasi awal, yaitu pemanasan awal pada suhu 95°C untuk

mendenaturasi kompleks DNA secara komplit. (2) Penempelan primer (*primer annealing*) pada temperature 55-72°C, (3) Polimerisasi untai baru DNA oleh DNA *polimerase*, yaitu secara normal dilakukan pada temperatur 72°C (merupakan temperatur optimal Taq DNA *polimerase*). Jumlah siklus yang diperlukan oleh sebagian besar PCR adalah 25-40 siklus (Manheim 1995).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis sekuensing dan BLAST-N diperoleh susunan nukleotida dengan panjang 1301 pasang basa dengan tingkat kemiripan 99% bakteri *Vibrio alginolyticus* strain CIFRI V-TSB1 dan berhasil didesain dua primer spesifik PCR dari sekuen gen 16S-rRNA *Vibrio alginolyticus* PNGK 1 yakni aSEFM-F (5-TTAGCCGGTGCTTCTTCTGT -3) dan aSEFM-R (5-CAGCCACACTGGAAGTGA -3). Kedua primer ini bereaksi optimum pada suhu 60°C dengan menghasilkan amplicon berukuran 201 pasang basa.

### TERIMA KASIH

Teman-teman di Laboratorium Kesehatan Ikan (LKI) dan Laboratorium Bioteknologi Molekular Ikan Departemen Budidaya Perairan (BDP) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.

### DAFTAR PUSTAKA

- Suwanto A. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis: A revolution in microbial genetic. *Aspac. J. Mol. Biotechnol.* 2:78-85. Dieffenbach dan Dveksler 1995).
- Rychlic W. 1995. Selection of primer for polymerase chain reaction. *Mol biotechnol* 3:129-134.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ. Microbiol* 64:795-9.
- Suwanto A. 2002. *Complication of Practical Manual. Biotrop Training Course in Microbial Biodiversity.*
- Rybicki EP, Purves M. 1996. Enzyme-assisted immunoelectroblotting (IEB or western blotting). Di dalam: Coyne VE, James MD, Reid SJ, Rybicki EP (ed) *Molecular Biology Techniques Manual*. Ed ke-3. Cape Town: Departemen of Microbiology University of Cape Town.