

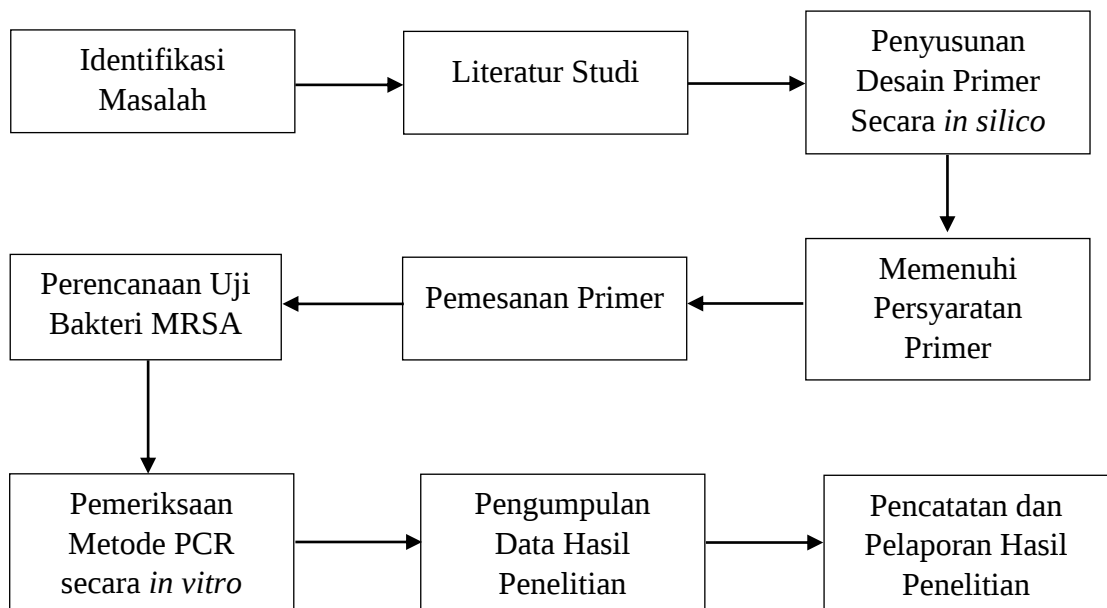
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif dengan metode kualitatif, seperti alur penelitian di bawah (Gambar 2). Pada penelitian ini akan menjelaskan hasil primer yang telah didesain sebelumnya di situs *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), NetPrimer, dan Benchling untuk deteksi gen *mecA* bakteri MRSA secara spesifik.

B. Alur Penelitian



Gambar 2 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret – April 2025.

D. Populasi dan Sampel

1. Unit analisis

Dalam penelitian ini, unit analisis meliputi desain primer, optimasi reaksi metode PCR, dan hasil pengujian PCR.

2. Sampel

Dalam penelitian ini, digunakan sampel DNA bakteri MRSA yang diekstraksi dari koloni murni bakteri MRSA ATCC 33591 yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan diremajakan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar.

3. Kriteria sampel

Dalam penelitian ini, kriteria sampel mencakup sampel yang disimpan dalam tabung *centrifuge* steril berukuran 15 ml, berisi hasil peremajaan bakteri MRSA dalam kondisi baik, tidak terkontaminasi atau rusak, dan telah disimpan sesuai prosedur yang benar sebelum dilakukan uji ekstraksi.

E. Prosedur Kerja

1. Alat

a. Alat desain primer

1) Laptop

b. Alat pembuatan media *Tryptic Soy Broth*

1) Erlenmeyer 1000 ml (Schott)

2) Gelas ukur 250 ml (Pyrex)

- 3) Beaker glass 1000 ml (Pyrex)
 - 4) Spatula
 - 5) *Hot-plate magnetic stirrer* (Jisico)
 - 6) *Autoclave* (Tomy SX-500)
 - 7) Tabung *centrifuge* (Biologix)
 - 8) Ose (Biologix)
 - 9) Neraca analitik (Radwag)
- c. Alat peremajaan bakteri
- 1) Bunsen
 - 2) Ose (Biologix)
 - 3) Inkubator (Gemmy Industrial Corp. YCO-010 Series)
- d. Alat pembuatan aquadest steril
- 1) Tabung reaksi (Pyrex)
 - 2) *Beaker glass* 1000 ml (Pyrex)
 - 3) Gelas ukur 10 ml (Pyrex)
 - 4) Rak tabung reaksi
 - 5) *Autoclave* (Tomy SX-500)
- e. Alat pembuatan suspensi bakteri
- 1) Bunsen
 - 2) Mikropipet (Socorex)
 - 3) *Vortex mixer* (Gemmy Industrial Corp. VM-300P)
 - 4) Densitometer (bioSan Den-1B)
- f. Alat ekstraksi DNA
- 1) Mikropipet (Socorex)

- 2) Bunsen
 - 3) Rak *microtube*
 - 4) *Refrigerated microcentrifuge* (Hanil M15R)
 - 5) *Vortex mixer* (Gemmy Industrial Corp. VM-300P)
 - 6) *Refrigerator* (Haier Biomedical)
 - 7) Inkubator (Gemmy Industrial Corp. YCO-010 Series)
- g. Alat analisis hasil ekstraksi kualitatif dan hasil PCR
- 1) Neraca analitik (Radwag)
 - 2) Gelas ukur (Pyrex)
 - 3) *Beaker glass* (Pyrex)
 - 4) Mikropipet (Socorex)
 - 5) Cetakan gel agarose (Biometra GmbH)
 - 6) *Hot-plate magnetic stirrer* (Jisico)
 - 7) Elektroforator (Biometra GmbH)
 - 8) *UV-Transluminator* (AnalyticJena)
- h. Alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- 1) *PCR thermal cyclers* (Biometra GmbH)
 - 2) *Laminar air flow* (AnalyticJena)
 - 3) *PCR tube* (Biologix)
 - 4) Mikropipet (Socorex)
 - 5) *Refrigerated microcentrifuge* (Hanil M15R)
 - 6) *Spindown* (Hermle)

2. Bahan

a. Bahan pembuatan media *Tryptic Soy Broth*

- 1) Media bubuk *Tryptic Soy Broth* (Liofilchem)
- 2) *Aquadest* (WaterOne)
- 3) *Aluminium foil* (Klinpak)

b. Bahan peremajaan bakteri

- 1) Bakteri MRSA ATCC 33591
- 2) Media *Tryptic Soy Broth* (Liofilchem) dalam tabung *centrifuge* (Biologix)

c. Bahan pembuatan aquadest steril

- 1) Kapas berlemak (OneMed)
- 2) *Aquadest* (WaterOne)
- 3) *Aluminium foil* (Klinpak)

d. Bahan pembuatan suspensi bakteri

- 1) Hasil peremajaan bakteri MRSA ATCC 33591 pada media *Tryptic Soy Broth*
- 2) *Aquadest* steril (WaterOne) pada tabung reaksi (Pyrex)
- 3) *Microtip* (Genfollower)

e. Bahan ekstraksi DNA

- 1) Hasil peremajaan bakteri MRSA ATCC 33591
- 2) Reagen *lysis buffer*
- 3) Reagen PCIA
- 4) Ethanol 96%
- 5) Ethanol 70%
- 6) Reagen TE (*tris*-EDTA)
- 7) *Microtube* (Genfollower)

8) *Microtip* (Genfollower)

f. Bahan analisis hasil ekstraksi kualitatif dan hasil PCR

1) Hasil ekstraksi DNA bakteri MRSA ATCC 33591 (DNA *template*)

2) Bubuk *agarose* (Cleaver Scientific)

3) *Ethidium bromide* (EtBr) (1st Base)

4) *Loading dye* (Qiagen)

5) DNA *ladder* 100 bp (Geneaid)

6) TAE *buffer* (Thermo Scientific)

7) *Nuclease Free Water* (NFW) (Invitrogen)

8) *Microtip* (Genfollower)

g. Bahan reaksi PCR

1) *Microtube* (Genfollower)

2) *Microtip* (Biologix)

3) *Master Mix* PCR (Ampliqon III)

4) Primer gen *mecA* (Integrated DNA Technologies)

5) *Nuclease Free Water* (NFW) (Invitrogen)

6) Hasil ekstraksi DNA bakteri MRSA ATCC 33591 (DNA *template*)

3. Pre analitik

Tahap pre analitik meliputi:

a. Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD), meliputi jas laboratorium, masker, haircap, dan handscoon

b. Disinfeksi daerah kerja

c. Persiapan alat kerja, meliputi disinfeksi, sterilisasi alat, serta *setting* alat sesuai keperluan

- d. Persiapan reagen, meliputi reagen disuhu ruangan dan di-*aliquot* sesuai keperluan

4. Analitik

a. Desain primer

- 1) Buka *website* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 2) Pilih *gene*.
- 3) Masukkan nama spesies dan gen yang akan dicari, lalu klik enter.
- 4) Setelah muncul beberapa pilihan gen, dilihat gen yang berupa DNA dengan melihat keterangan di bagian bawah nama gen. Apabila di akhir pembuatan design primer hingga pengujian apakah primer spesifik atau tidak menggunakan BLAST didapatkan bahwa primer tidak spesifik, tahap ini dapat diulangi dengan memilih gen yang lain agar didapat primer yang spesifik.
- 5) Pilih salah satu gen yang berupa DNA.
- 6) Setelah muncul informasi mengenai gen yang dipilih, klik “FASTA”, lalu salin gen dan pindahkan ke *notepad*.
- 7) Setelah dipindahkan ke *notepad*, simpan file dengan format FASTA.
- 8) Selanjutnya, pada *website* NCBI pilih menu *PrimerBLAST*.
- 9) *Upload* file FASTA pada bagian *PCR Template*.
- 10) Klik *get primers*.
- 11) Didapatkan 10 pasang primer yang selanjutnya akan dipilih melalui *website NetPrimer*.
- 12) Buka *website NetPrimer* (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).
- 13) Lakukan proses *log in*.

- 14) Setelah itu, klik *launch NetPrimer*.
- 15) Pada bagian *Oligo Analysis*, masukkan nama primer dan deskripsi.
- 16) Ketik primer *forward* kandidat pertama pada bagian *sequence #1* dan primer *reverse* kandidat pertama pada bagian *sequence #2*.
- 17) Klik *analyze*, amati hasil analisis.
- 18) Lakukan langkah yang sama pada kandidat primer kedua hingga kandidat primer kesepuluh.
- 19) Setelah mengamati hasil analisis, didapatkan pasangan primer nomor 10 yang paling memenuhi kriteria, kemudian dilanjutkan dengan pengecekan karakteristik primer pada *website benchling*.
- 20) Buka *website benchling* (<https://www.benchling.com/>), lalu *log in* atau *sign up* (apabila belum memiliki akun).
- 21) Pada “*Projects*”, klik tanda tambah (+) pada bagian kanan atas, klik “*create projects*”.
- 22) Setelah itu, layar akan menampilkan folder “*projects*” yang sudah dibuat. Pada *projects* tersebut, klik tanda tambah (+) pada bagian kanan atas, klik “*DNA/RNA sequence*”, lalu pilih “*New DNA/RNA sequence*”.
- 23) Pilih “*Upload Files*”, lalu *upload* file FASTA. Kemudian, sekuens DNA akan langsung terlihat pada layar.
- 24) Klik *ctrl + A*, *ctrl + F*, lalu *paste* primer *forward* yang telah didapatkan. Pada sekuens DNA akan terlihat untaian basa yang terdeteksi sebagai primer *forward*. Kemudian, klik “*Create Primer*” dan pilih “*Forward*”. Primer akan tersimpan sebagai primer *forward*. Lakukan langkah yang sama untuk primer *reverse*.

- 25) Selanjutnya, klik untaian basa primer *forward*, klik *shift*, lalu klik untaian basa primer *reverse*. Lalu, klik “*Primers*” pada bagian kanan dengan lambing menyerupai tanda sama dengan (=). Centang kedua primer, kemudian pilih “*Link Primers*” dan klik “*Check Secondary Structures*”.
- 26) Setelah itu, akan terlihat analisa *secondary structures* dari pasangan primer tersebut. Kajiilah pasangan primer tersebut sesuai kriteria primer yang baik untuk digunakan.
- 27) Selanjutnya, cek spesifisitas primer di *NucleotideBLAST*.
- 28) Pada “*Enter Query Sequence*”, ketik primer *forward*.
- 29) Pada “*Database*”, pilih “*Nucleotide collection (nr/nt)*”.
- 30) Pada *Program Selection*, pilih “*Optimize for somewhat similar sequences (blastn)*”.
- 31) Klik “*Show result in a new window*”, lalu klik “*Blast*”.
- 32) Didapatkan hasil uji spesifisitas primer pada 100 sekuens dengan similaritas tertinggi.
- 33) Ulangi langkah uji spesifisitas yang sama pada primer *reverse*.
- 34) Apabila primer sudah spesifik terhadap bakteri yang diinginkan, maka primer dapat dipesan ke vendor penyedia sintesis oligonukleotida.

b. Pembuatan media *Tryptic Soy Broth*

- 1) Timbang bubuk *Tryptic Soy Broth* pada neraca analitik sebanyak 3 gram.
- 2) Tuangkan pada labu erlenmeyer.
- 3) Tambahkan 100 ml *aquadest* pada labu erlenmeyer.
- 4) Larutkan media pada *hotplate magnetic stirrer* dengan suhu 100°C dan kecepatan 50 RPM.

- 5) Sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 6) Diamkan media hingga mencapai suhu ruang.
- 7) Tuangkan media sebanyak 10 ml pada masing-masing tabung *centrifuge* steril.

c. Peremajaan bakteri

- 1) Inokulasikan masing-masing 2 – 3 koloni bakteri MRSA ATCC 33591 dari media ke dalam tabung *centrifuge* menggunakan ose.
- 2) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan aquadest steril

- 1) Tuang *aquadest* pada gelas ukur hingga mencapai 10 ml.
- 2) Tuang ke tabung reaksi pertama.
- 3) Tutup tabung dengan kapas berlemak dan *aluminium foil*.
- 4) Ulangi langkah tersebut hingga tabung keenam.
- 5) Sterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

e. Pembuatan suspensi bakteri

- 1) Buang *supernatant* pada tabung *centrifuge* berisi hasil peremajaan bakteri MRSA.
- 2) Pipet sedikit demi sedikit *pellet* bakteri MRSA dari dasar tabung *centrifuge* ke dalam tabung reaksi berisi *aquadest* steril.
- 3) Homogenkan menggunakan *vortex mixer*.
- 4) Letakkan pada alat densitometer hingga mencapai 1,0 *McFarland*.

f. Ekstraksi DNA bakteri MRSA

- 1) Pipet 1000 µL atau 1 ml suspensi ke *microtube* (A).
- 2) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 10.000 RPM selama 1 menit.

- 3) Setelah sentrifugasi, buang *supernatant*.
- 4) Tambahkan 500 μ L lisis *buffer* pada *microtube* (A), homogenkan.
- 5) Tambahkan 500 μ L *lower phase* PCIA pada *microtube* (A), homogenkan.
- 6) Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- 7) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 8) Setelah sentrifugasi, pindahkan *upper phase* dari *microtube* (A) ke *microtube* (B).
- 9) Tambahkan 700 μ L larutan Ethanol 96% pada *microtube* (B), homogenkan.
- 10) Inkubasi *microtube* (B) pada suhu -80°C selama 5 menit.
- 11) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 10 menit.
- 12) Setelah sentrifugasi, buang *supernatant*.
- 13) Tambahkan 500 μ L larutan Ethanol 70% pada *microtube* (B), homogenkan.
- 14) Inkubasi *microtube* (B) pada suhu -80°C selama 5 menit.
- 15) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 16) Setelah sentrifugasi, buang *supernatant*.
- 17) Tambahkan 50 μ L larutan TE (*tris*-EDTA) *buffer* pada *microtube* (B), homogenkan.

g. Analisis hasil ekstraksi DNA secara kualitatif

- 1) Timbang bubuk *agarose* sebanyak 2,25 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan larutkan menggunakan 150 ml TAE *buffer* 1x pada *hotplate* hingga larutan berwarna bening.

- 2) Tambahkan *staining gel* sebanyak 5 µl pada larutan *agarose* kemudian homogenkan.
 - 3) Tuangkan larutan *agarose* ke cetakan gel elektroforesis, pasang sisir untuk mencetak *well* pada gel *agarose*.
 - 4) Tunggu hingga larutan memadat membentuk gel, kemudian cabut sisir.
 - 5) Pindahkan gel *agarose* ke elektroforator dan tuangkan TAE *buffer* 1x hingga gel terendam.
 - 6) Pipet DNA *ladder* sebanyak 6 µl dan letakkan pada *well* pertama.
 - 7) Untuk sampel, pipet sebanyak 5 µl kemudian tambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1 µl, homogenkan dengan cara memipet dan mengeluarkan sampel secara berulang, pipet sampel sebanyak 6 µl ke *well* selanjutnya.
 - 8) Setelah seluruh sampel selesai dipipet, *setting* alat elektroforator pada 77 volt, 200 *ampere*, dan 60 menit.
 - 9) Setelah proses elektroforesis selesai, amati hasil elektroforesis pada UV-*Transluminator*.
- h. Proses PCR dengan optimasi
- 1) Proses PCR dimulai dengan membuat PCR *mix* pada PCR *tube* sebanyak 24 reaksi sebagai berikut.

Tabel 2
Komposisi Reaksi PCR

Reagen	Konsentrasi	
	1 X	24 X
1	2	3
Ampliqon III Taq 2x <i>Master Mix</i>	12,5 µL	300 µL
10 µM primer <i>forward</i>	0,5 µL	12 µL

1	2	3
10 μM primer reverse	0,5 μ L	12 μ L
Nuclease Free Water	7,5 μ L	180 μ L
DNA template	4 μ L	96 μ L
Final Volume	25 μ L	600 μ L

- 2) Lakukan homogenisasi reagen menggunakan *vortex mixer* dan *spindown* beberapa detik agar larutan yang menempel pada tutup dan dinding tabung turun ke bawah.
- 3) Dilanjutkan ke tahap optimasi PCR pertama pada alat *thermal cycler* yang diawali dengan *setting* pada alat dengan menambahkan step PCR, seperti pada tabel berikut.

Tabel 3
Optimasi PCR Pertama

Tahapan	Suhu	Waktu	Cycle
Pre denaturasi	95°C	5 menit	1x
Denaturasi	95°C	30 detik	30x
Annealing	47,5°C – 55,6°C	30 detik	
Extension	72°C	30 detik	
Final extension	72°C	5 menit	1x

- 4) Letakkan 12 sampel pertama yang akan di *running* pada alat *thermal cycler*.
- 5) Tutup alat *thermal cycler*.
- 6) Klik *start* untuk memulai proses PCR.
- 7) Tunggu hingga selesai *running*.
- 8) Setelah selesai *running*, simpan hasil PCR pada suhu 4°C.

- 9) Dilanjutkan ke tahap optimasi PCR kedua pada alat *thermal cycler* yang diawali dengan *setting* pada alat dengan menambahkan step PCR, seperti pada tabel berikut.

Tabel 4
Optimasi PCR Kedua

Tahapan	Suhu	Waktu	Cycle
Pre denaturasi	95°C	5 menit	1x
Denaturasi	95°C	30 detik	30x
Annealing	55,5°C – 63,6°C	30 detik	
Extension	72°C	30 detik	
Final extension	72°C	5 menit	1x

- 10) Letakkan 12 sampel kedua yang akan di *running* pada alat *thermal cycler*.
- 11) Tutup alat *thermal cycler*.
- 12) Klik *start* untuk memulai proses PCR.
- 13) Tunggu hingga selesai *running*.
- 14) Analisis 24 sampel hasil PCR dengan elektroforesis.
- i. Analisis hasil PCR secara kualitatif
- 1) Timbang bubuk *agarose* sebanyak 2,25 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan larutkan menggunakan 150 ml TAE *buffer* 1x pada *hotplate* hingga larutan berwarna bening.
 - 2) Tambahkan *staining gel* sebanyak 5 µl pada larutan *agarose* kemudian homogenkan.
 - 3) Tuangkan larutan *agarose* ke cetakan gel elektroforesis, pasang sisir untuk mencetak *well* pada gel *agarose*.
 - 4) Tunggu hingga larutan memadat membentuk gel, kemudian cabut sisir.

- 5) Pindahkan gel *agarose* ke elektroforator dan tuangkan TAE *buffer* 1x hingga gel terendam.
- 6) Pipet DNA *ladder* sebanyak 6 μ l dan letakkan pada *well* pertama.
- 7) Pipet sampel hasil PCR sebanyak 6 μ l ke *well* selanjutnya.
- 8) Setelah seluruh sampel selesai dipipet, setting alat elektroforator pada 77 *volt*, 200 *ampere*, dan 60 menit.
- 9) Setelah proses elektroforesis selesai, amati hasil elektroforesis pada UV-*Transluminator*.

5. Pasca analitik

- a. Melakukan pengamatan, pencatatan, dan mendokumentasikan hasil yang didapat

- b. Melakukan pencucian alat yang digunakan

1) Pencucian alat gelas

Meliputi *beaker glass* dan erlenmeyer. Buang sisa larutan dan bilas dengan air mengalir. Rendam dalam larutan deterjen laboratorium selama 15 – 30 menit untuk menghilangkan residu. Sikat bagian dalam dengan sikat botol steril. Bilas dengan air hingga bersih. Keringkan di rak pengering, lalu simpan pada lemari penyimpanan.

2) Pencucian mikropipet

Mikropipet tidak boleh direndam langsung dalam air karena dapat merusak mekanisme internal. Lap bagian luar dengan ethanol 70% atau disinfektan. Jika terkontaminasi sampel biologis, bilas ujungnya dengan air bebas nuklease. Gunakan udara tekan atau isopropanol untuk membersihkan bagian dalam piston. Simpan dalam posisi tegak di rak mikropipet.

3) Pencucian elektroforator

Meliputi bak elektroforesis, *gel tray*, dan *comb*. Bilas dengan air suling untuk menghilangkan sisa *buffer* TAE. Rendam dalam larutan deterjen lembut selama 15 menit. Sikat lembut bagian dalam jika ada sisa *agarose*. Bilas dengan NFW agar tidak ada kontaminasi DNA. Keringkan sebelum penyimpanan.

c. Menyimpan sisa bahan yang digunakan

1) Penyimpanan sisa reagen kimia

Meliputi reagen PCIA, *buffer*, reagen elektroforesis, dan reagen PCR. Wadah reagen PCIA dilapisi dengan *aluminium foil* agar tidak terkena cahaya. Seluruh reagen disimpan pada suhu 4°C untuk penggunaan dalam waktu dekat atau pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka panjang.

2) Penyimpanan sisa kultur bakteri MRSA

Meliputi sisa kultur bakteri pada *plate* agar dan tabung centrifuge *Tryptic Soy Broth* (TSB). Untuk penyimpanan jangka panjang, simpan dalam larutan gliserol 15 – 20% pada suhu -80°C. Apabila akan digunakan kembali, simpan pada suhu 4°C selama 1 – 2 minggu.

d. Melakukan pembuangan limbah

1) Limbah infeksius

Meliputi *supernatant* atau cairan sisa ekstraksi, mikrotip, dan ose *disposable* yang terkena sampel. Tempatkan cairan, mikrotip, dan ose pada plastik *autoclave*, kemudian lakukan proses sterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 120°C selama 15 – 30 menit untuk membunuh bakteri. Setelah itu, limbah dapat dibuang pada tempat sampah *biohazard*.

2) Limbah biologi

Meliputi sisa hasil PCR, gel *agarose*, serta sampel DNA yang sudah tidak digunakan. Setelah digunakan, gel *agarose* ditempatkan pada wadah khusus limbah gel *agarose*. Sedangkan, sampel DNA pada *microtube* dan sisa hasil PCR pada tabung *eppendorf* ditempatkan pada plastik *autoclave* yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 120°C selama 15 – 30 menit untuk membunuh bakteri. Setelah itu, limbah dapat dibuang pada tempat sampah *biohazard*.

3) Limbah umum

Meliputi *handscoon*, *haircap*, masker, dan tisu. Apabila terkontaminasi dengan bahan infeksius, tempatkan pada plastik *autoclave* yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 120°C selama 15 – 30 menit sebelum dibuang. Apabila tidak terkontaminasi, dapat dibuang sebagai limbah domestik biasa.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Pada penelitian ini, data primer didapatkan secara *in silico*, yaitu melalui desain primer untuk gen *mecA* bakteri MRSA dan hasil amplifikasi DNA.

b. Data sekunder

Pada penelitian ini, data sekunder berupa sekuens gen *mecA* bakteri MRSA yang diperoleh dari *Gene Bank* di situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Teknik pengumpulan data

Berikut adalah teknik pengumpulan data yang diterapkan pada penelitian ini:

- a. Observasi, yaitu dengan mengamati pendaran pita DNA pada hasil PCR menggunakan *UV-Transluminator*.
- b. Studi literatur, yang bertujuan untuk mengumpulkan data terkait sekuens bakteri dan perancangan primer.
- c. Pemeriksaan laboratorium, yang mencakup pelaksanaan PCR dengan optimasi untuk memperoleh metode yang optimal dalam penggunaan desain primer untuk deteksi gen *mecA* bakteri MRSA.

3. Instrumen pengumpulan data

Berikut adalah instrumen pengumpulan data yang digunakan pada penelitian ini:

- a. Kertas pengamatan, untuk mencatat atau mengumpulkan hasil dan data saat melalui pengamatan pada penelitian di lapangan.
- b. Komputer atau laptop, untuk melakukan penelitian secara *in silico*.
- c. *Handphone*, untuk dokumentasi seluruh aktivitas pada saat penelitian berlangsung.
- d. Peralatan laboratorium (PCR *thermal cycler*, Elektroforator, *Nanodrop Spektrofotometer*, dan *UV-Transluminator*), sebagai instrumen untuk mendapatkan data hasil pemeriksaan.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Berikut langkah-langkah pengolahan data yang penulis lakukan:

- a. Pemeriksaan data (*Editing*), merupakan proses melakukan pemeriksaan dan pengumpulan data yang digunakan untuk penelitian.

- b. Pemberian kode (*Coding*), merupakan tahapan kegiatan mengklasifikasikan atau pemberian label pada data, sehingga untuk memudahkan dalam pemilahan data yang diinginkan. Pada penelitian ini pemberian kode dilakukan pada saat optimasi suhu *annealing*, dimana hasil berbagai suhu yang digunakan akan diberi tanda atau label.
- c. Pemasukan data (*Entry*), merupakan tahapan memproses data agar dapat dianalisis. Kertas pengamatan dan hasil dokumentasi penelitian dikumpulkan.
- d. Penyusunan data (*Tabulating*), merupakan penyajian data dalam bentuk tabel, gambar, atau daftar untuk memudahkan dalam pengamatan dan evaluasi. Hasil penelitian ini berupa amplifikasi DNA gen *mecA* bakteri MRSA dengan primer yang didesain secara *in silico* dengan suhu optimasi yang tepat secara metode PCR.

2. Analisis data

Pada penelitian ini, data dijabarkan berupa tabel, gambar, dan narasi. Data berupa primer yang didesain dengan metode *in silico* pada website NCBI, NetPrimer, dan Benchling. Hasil penelitian yang telah dianalisis secara kualitatif selanjutnya diproses secara manual dalam bentuk narasi dengan kajian pustaka yang sesuai.