

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Desain primer gen *mecA* bakteri MRSA

Desain primer dilakukan secara *in silico* pada situs *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) Primer-BLAST dan didapatkan 10 pasang kandidat primer seperti yang tertera pada Tabel 5.

Tabel 5
Hasil Perancangan Primer pada NCBI Primer-BLAST

Kandidat	Primer	Panjang Basa	Tm	%GC	Ukuran Produk
Primer 1	TCCACCCTCAAACAGGTGAA	20 bp	58,78°C	50,00%	757 bp
	TCTGCAGTACCGGATTTGCC	20 bp	60,35°C	50,00%	
Primer 2	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	21 bp	59,72°C	52,38%	761 bp
	CTGCAGTACCGGATTTGCCA	20 bp	60,68°C	55,00%	
Primer 3	TTGGCCAATACAGGAACAGCA	21 bp	60,20°C	47,62%	571 bp
	GGTGGATAGCAGTACCTGAGC	21 bp	59,93°C	57,14%	
Primer 4	GCTATCCACCCTCAAACAGGT	21 bp	59,72°C	52,38%	285 bp
	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	21 bp	59,79°C	47,62%	
Primer 5	ACGGTAACATTGATCGCAACG	21 bp	59,61°C	47,62%	598 bp
	TCGTCAACGATTGTGACACG	20 bp	58,87°C	50,00%	
Primer 6	TCAGGTACTGCTATCCACCCT	21 bp	59,71°C	52,38%	816 bp
	AAACCACCCAATTTGTCTGCC	21 bp	59,58°C	47,62%	
Primer 7	TTGGCCAATACAGGAACAGC	20 bp	58,46°C	50,00%	422 bp
	ACGATTGTGACACGATAGCCA	21 bp	59,80°C	47,62%	
Primer 8	TGGCTCAGGTACTGCTATCCA	21 bp	60,34°C	52,38%	297 bp
	ACGTTGTAACCACCCCAAGAT	21 bp	59,58°C	47,62%	
Primer 9	GGCTCAGGTACTGCTATCCA	20 bp	58,59°C	55,00%	300 bp
	TGTAACGTTGTAACCACCCCA	21 bp	59,51°C	47,62%	
Primer 10	TGGCTCAGGTACTGCTATCC	20 bp	58,59°C	55,00%	156 bp
	TGGAAC TTGTTGAGCAGAGGT	21 bp	59,51°C	47,62%	

Kesepuluh pasang kandidat primer yang tertera pada Tabel 5 memiliki panjang basa berkisar 20 – 21 bp. Secara teoritis, primer idealnya memiliki panjang 18 – 30 bp, sehingga kesepuluh pasang primer memenuhi syarat panjang

primer ideal. Nilai suhu leleh atau *temperature melting* (T_m) kesepuluh pasang primer berkisar antara 58,46 – 60,68°C. Suhu leleh idealnya berkisar antara 50 – 65°C, sehingga kesepuluh pasang primer dianggap memenuhi syarat. Seluruh primer yang telah didesain memiliki persentase *Guanine* dan *Cytosine* sebesar 47,62 hingga 57,14%. Persentase GC merupakan jumlah basa guanin dan sitosin dalam suatu primer yang terkait dengan suhu leleh yang idealnya berkisar antara 40 – 60%, sehingga kesepuluh pasang primer dianggap memenuhi syarat. Ukuran produk yang dihasilkan oleh kesepuluh pasang primer bervariasi dari 156 – 816 bp. Produk PCR yang ideal umumnya berada dalam rentang 100 hingga 1000 pasangan basa (bp), sehingga kesepuluh pasang primer dianggap memenuhi syarat.

Selanjutnya, dilakukan pengujian terhadap karakteristik struktur sekunder kesepuluh pasang kandidat primer pada situs NetPrimer, didapatkan hasil yang tertera pada Tabel 6.

Tabel 6
Karakteristik Struktur Sekunder Kandidat Primer pada NetPrimer

Kandidat	Primer	Self Dimer	Hairpin	Repeat (# of pairs)	Run (# of bases)	Rating
1	2	3	4	5	6	7
Primer 1	TCCACCCTCAAACAGGTGAA	-7,37	-3,27	0	3	82
	TCTGCAGTACCGGATTTGCC	-10,24	-1,79	0	3	79
Primer 2	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	-5,67	-1,27	0	3	88
	CTGCAGTACCGGATTTGCCA	-10,24	-1,79	0	3	79
Primer 3	TTGGCCAATACAGGAACAGCA	-17,07	0	0	0	69
	GGTGGATAGCAGTACCTGAGC	-4,55	-0,11	0	0	91
Primer 4	GCTATCCACCCTCAAACAGGT	-5,67	-1,31	0	3	87
	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	-10,17	-0,7	0	4	80
Primer 5	ACGGTAACATTGATCGCAACG	-4,9	-0,4	0	0	90
	TCGTCAACGATTGTGACACG	-6,53	-5,19	0	0	80
Primer 6	TCAGGTACTGCTATCCACCCT	-5,67	-1,11	0	3	88
	AAACCACCCAATTTGTCTGCC	-5,36	0	0	3	90
Primer 7	TTGGCCAATACAGGAACAGC	-17,07	0	0	0	69
	ACGATTGTGACACGATAGCCA	0	0	0	0	100

1	2	3	4	5	6	7
Primer 8	TGGCTCAGGTACTGCTATCCA	-6,02	-0,22	0	0	88
	ACGTTGTAACCACCCCAAGAT	-6,3	-0,7	0	4	87
Primer 9	GGCTCAGGTACTGCTATCCA	-3,65	0	0	0	93
	TGTAACGTTGTAACCACCCCA	-10,18	0	0	4	81
Primer 10	TGGCTCAGGTACTGCTATCC	-3,65	0	0	0	93
	TGGAAC TTGTTGAGCAGAGGT	0	0	0	0	100

Hasil analisis struktur sekunder pada seluruh pasangan primer di situs NetPrimer menampilkan hasil yang bervariasi. *Self dimer* merupakan primer yang dapat berikatan dengan primer sejenis lain yang stabilitasnya ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -6 kcal/mol. Berdasarkan hasil analisis struktur sekunder pada Tabel 6, pasangan primer yang paling memenuhi syarat adalah pasangan primer 10 dengan *self dimer* pada primer *forward* -3,65 kcal/mol yang lebih positif dari -6 kcal/mol dan tidak adanya *self dimer* pada primer *reverse*. *Hairpin* merupakan suatu kondisi di mana ujung primer saling berikatan. Stabilitas struktur *hairpin* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -3 kcal/mol. Pada Tabel 6, pasangan primer dengan nilai *hairpin* 0 ditunjukkan oleh pasangan primer 7, 9, dan 10 yang menandakan bahwa kedua ujung primer tidak saling berikatan.

Run merupakan pengulangan urutan satu basa yang sama, seperti CCCC pada primer *reverse* 8. *Repeat* merupakan pengulangan dua basa yang sama, seperti TATATA. Keberadaan *run* dan *repeat* pada primer akan menyebabkan *false priming* pada proses PCR. Secara umum, *run* yang ditoleransi tidak lebih dari 4 basa yang sama berturut-turut dan *repeat* yang ditoleransi tidak lebih dari 3 pola pendek berulang (Praja dan Rosalina, 2021). Berdasarkan Tabel 6, pasangan primer dengan nilai *run* dan *repeat* 0 pada kedua primer ditunjukkan oleh

pasangan primer 3, 5, 7, dan 10 yang menandakan bahwa tidak adanya *run* atau *repeat* pada primer *forward* maupun primer *reverse*.

Secara keseluruhan, hasil pengujian karakteristik struktur sekunder primer dengan *rating* mendekati sempurna adalah pasangan primer nomor 10 dengan primer *forward* 5'-TGGCTCAGGTACTGCTATCC-3' dan primer *reverse* 5'-TGGAACCTTGTTGAGCAGAGGT-3' yang menghasilkan ukuran produk 156 bp. Pasangan primer gen *mecA* yang terpilih tersebut kemudian diuji kembali karakteristik struktur sekundernya pada situs Benchling. Hasil uji karakteristik struktur sekunder secara keseluruhan kemudian disesuaikan dengan syarat karakteristik primer. Hasil dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7
Karakteristik Primer *mecA*

Syarat Primer	Standar	Karakteristik Primer		Kesesuaian
		Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	
Panjang basa	18 – 30 bp	20 bp	21 bp	Sesuai
%GC	40 – 60%	55,00%	47,62%	Sesuai
<i>Temperature melting</i> (Tm)	50 – 65°C	58,59°C	59,51°C	Sesuai
<i>Repeat</i>	Maksimal 4	0	0	Sesuai
<i>Run</i>	Maksimal 3	0	0	Sesuai
Nilai <i>hairpin</i>	≥ -3 kkal/mol	0 kkal/mol	0 kkal/mol	Sesuai
Nilai <i>self dimer</i>	≥ -6 kkal/mol	-3,65 kkal/mol	0 kkal/mol	Sesuai
Nilai ΔG homodimer	≥ -6 kkal/mol	-2,49 kkal/mol	-2,86 kkal/mol	Sesuai
Nilai ΔG heterodimer	≥ -6 kkal/mol	-4,21 kkal/mol		Sesuai

Berdasarkan Tabel 7, diketahui bahwa pasangan primer gen *mecA* telah memenuhi seluruh syarat karakteristik primer yang ideal. Selanjutnya dilakukan pengujian terhadap spesifisitas primer secara *in silico* pada situs NCBI Nucleotide BLAST. Hasil uji spesifisitas primer *forward* dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8
Hasil NCBI Nucleotide BLAST Primer *Forward mecA*

Deskripsi	Kesamaan	Nomor akses
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP173756.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP173757.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172295.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172294.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172293.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172291.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172292.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172285.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172284.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172283.1

Tabel 8 menampilkan 10 organisme teratas dari 100 organisme dengan gen yang memiliki kemiripan tertinggi dengan primer *forward mecA*. Uji similaritas pada primer tersebut menunjukkan hasil kemiripan sebesar 100% dengan gen *mecA* yang dimiliki oleh MRSA dengan nomor akses CP173756.1, CP173757.1, CP172295.1, CP172294.1, CP172293.1, CP172291.1, CP172292.1, CP172285.1, CP172284.1, dan CP172283.1. Sehingga, primer *forward* 5'-TGGCTCAGGTACTGCTATCC-3' dinilai spesifik terhadap gen *mecA* bakteri MRSA. Selanjutnya, hasil uji spesifisitas primer *reverse* dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9
Hasil NCBI Nucleotide BLAST Primer Reverse *mecA*

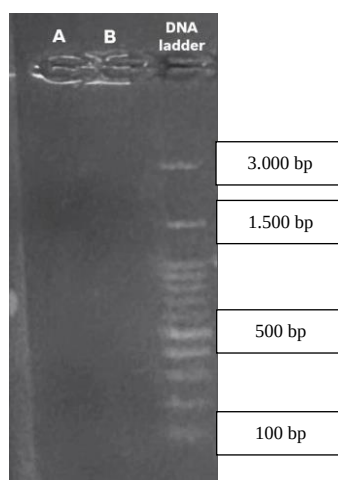
Deskripsi	Kesamaan	Nomor akses
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP173756.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP173757.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172295.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172294.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172293.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172291.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172292.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172285.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172284.1
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA	100%	CP172283.1

Tabel 9 menampilkan 10 organisme teratas dari 100 organisme dengan gen yang memiliki kemiripan tertinggi dengan primer *reverse mecA*. Uji similaritas pada primer tersebut menunjukkan hasil kemiripan sebesar 100% dengan gen *mecA* yang dimiliki oleh MRSA dengan nomor akses CP173756.1, CP173757.1, CP172295.1, CP172294.1, CP172293.1, CP172291.1, CP172292.1, CP172285.1, CP172284.1, dan CP172283.1. Sehingga, primer *reverse* 5'-TGGAAGTTGTTGAGCAGAGGT-3' dinilai spesifik terhadap gen *mecA* bakteri MRSA. Selanjutnya, dilakukan optimasi metode PCR menggunakan pasangan primer gen *mecA* yang telah dirancang.

2. Hasil optimasi PCR dan hasil identifikasi gen *mecA*

Identifikasi gen *mecA* dilakukan pada sampel DNA koloni bakteri MRSA ATCC 33591 yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan diremajakan di Laboratorium Terpadu

Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar menggunakan reaksi PCR yang optimal dengan primer spesifik. Ekstraksi DNA bakteri MRSA dilakukan dengan metode *Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol* (PCIA). Didapatkan dua hasil ekstraksi dengan kode A dan B untuk memenuhi kebutuhan DNA *template* pada proses PCR yang akan dilakukan sebanyak dua kali. Hasil ekstraksi selanjutnya dianalisis secara kualitatif menggunakan gel elektroforesis. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 3.



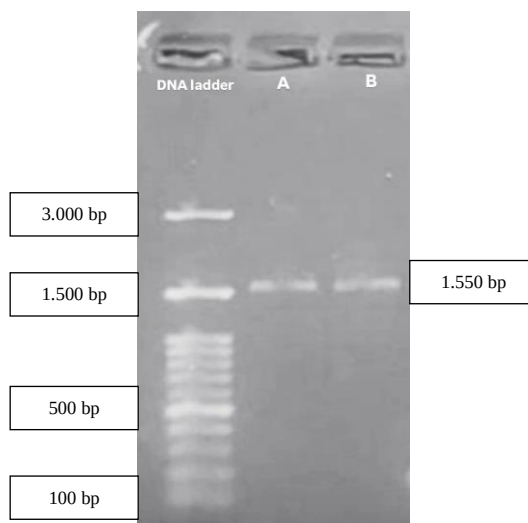
Gambar 3 Hasil Ekstraksi DNA

Keterangan:

A : Hasil ekstraksi DNA MRSA ATCC 33591 I

B : Hasil ekstraksi DNA MRSA ATCC 33591 II

Berdasarkan hasil analisis ekstraksi secara kualitatif pada Gambar 3, didapatkan *band* atau pita yang berpendar pada *well* A dan B. Untuk memastikan bahwa pendaran pita adalah DNA bakteri, maka dilakukan PCR *internal control* dengan primer gen 16s rRNA. Hasil PCR *internal control* dikatakan positif apabila terbentuk *band* pada ukuran 1.550 bp. Hasil PCR dianalisis secara kualitatif menggunakan elektroforesis seperti pada Gambar 4.



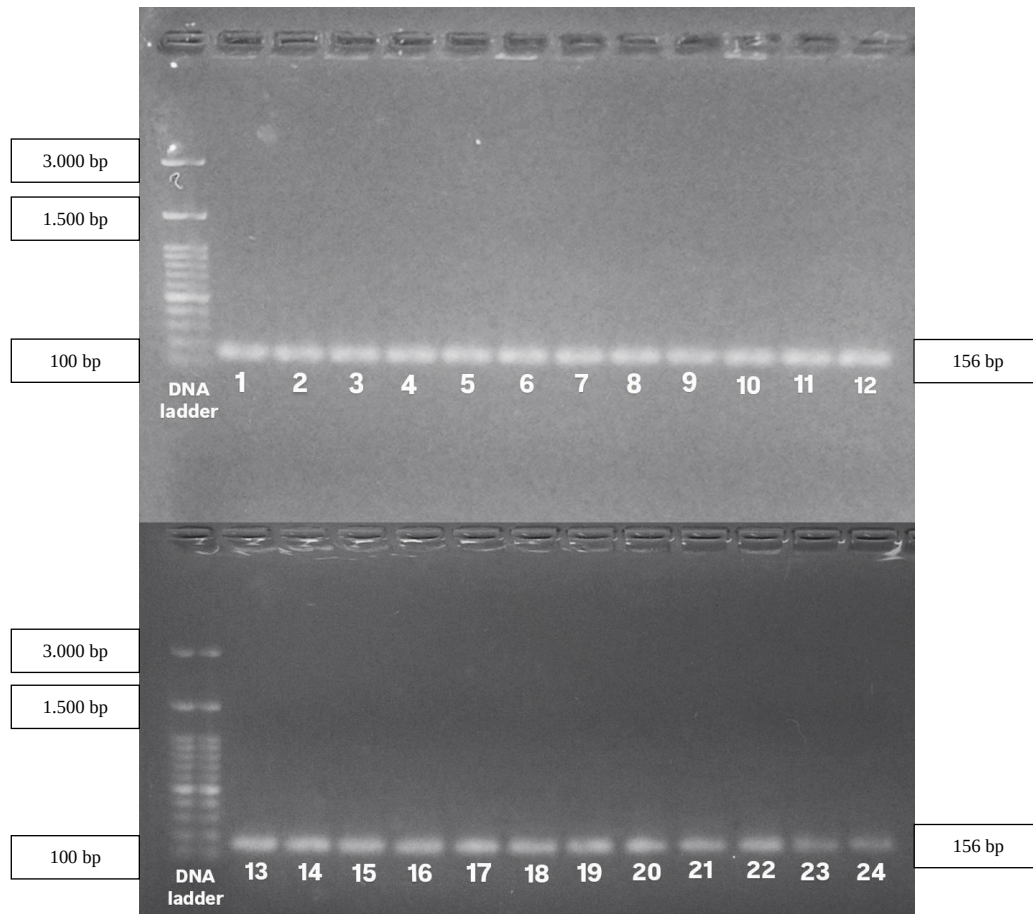
Gambar 4 Hasil PCR *Internal Control*

A : Hasil PCR *internal control* DNA MRSA ATCC 33591 I

B : Hasil PCR *internal control* DNA MRSA ATCC 33591 II

Hasil PCR *internal control* menunjukkan adanya *band* berukuran 1.550 bp pada kedua hasil ekstraksi yang menandakan hasil ekstraksi terbukti mengandung DNA bakteri. Penelitian dilanjutkan dengan optimasi PCR menggunakan primer *mecA* yang telah dirancang. Optimasi PCR dilakukan sebanyak dua kali dengan PCR *gradient*. Pada optimasi pertama, digunakan DNA *template* hasil ekstraksi A dengan suhu pre denaturasi 95°C, suhu denaturasi 95°C, suhu *annealing* 51,0°C dengan *gradient increase* 1,0°C dan didapatkan variasi suhu mulai dari 47,5°C hingga 55,6°C, suhu *extension* 72°C, serta suhu *final extension* 72°C dengan 30 kali pengulangan siklus. Sedangkan pada optimasi kedua, digunakan DNA *template* hasil ekstraksi B dengan suhu pre denaturasi 95°C, suhu denaturasi 95°C, suhu *annealing* 59,0°C dengan *gradient increase* 1,0°C dan didapatkan variasi suhu mulai dari 55,5°C hingga 63,6°C, suhu *extension* 72°C, serta suhu *final extension* 72°C dengan 30 kali pengulangan siklus.

Setelah proses PCR selesai, dilakukan analisis hasil optimasi PCR secara kualitatif menggunakan gel elektroforesis. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5 Hasil Optimasi PCR

Berdasarkan Gambar 5, hasil yang diperoleh menunjukkan *band* berukuran 156 bp dengan intensitas pita DNA yang bervariasi. Hal ini menandakan primer *mecA* dengan *primer forward* 5'-TGGCTCAGGTACTGCTATCC-3' dan *primer reverse* 5'-TGGAACCTTGTTGAGCAGAGGT-3' telah berhasil mengamplifikasi gen *mecA* pada isolat MRSA ATCC 33591. Selanjutnya, dilakukan analisis *band* atau pita DNA untuk menentukan suhu *annealing* yang paling optimal. Hasil dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10
Hasil Analisis Pita DNA Gen *mecA*

Kode Sampel	Suhu <i>Annealing</i>	Hasil
1	47,5°C	Terlihat <i>band smear</i>
2	47,7°C	Terlihat <i>band smear</i>
3	48,2°C	Terlihat <i>band smear</i>
4	49,0°C	Terlihat <i>band smear</i>
5	50,0°C	Terlihat <i>band smear</i>
6	51,0°C	Terlihat <i>band smear</i>
7	52,1°C	Terlihat <i>band smear</i>
8	53,1°C	Terlihat <i>band smear</i>
9	54,1°C	Terlihat <i>band smear</i>
10	54,9°C	Terlihat <i>band smear</i>
11	55,4°C	Terlihat <i>band smear</i>
12	55,6°C	Terlihat <i>band smear</i>
13	55,5°C	Terlihat <i>band</i> dengan intensitas tajam
14	55,7°C	Terlihat <i>band smear</i>
15	56,2°C	Terlihat <i>band</i> tipis
16	57,0°C	Terlihat <i>band</i> tipis
17	58,0°C	Terlihat <i>band smear</i>
18	59,0°C	Terlihat <i>band</i> redup
19	60,1°C	Terlihat <i>band smear</i>
20	61,1°C	Terlihat <i>band smear</i>
21	62,1°C	Terlihat <i>band</i> redup
22	62,9°C	Terlihat <i>band</i> tipis
23	63,4°C	Terlihat <i>band</i> redup
24	63,6°C	Terlihat <i>band</i> redup

Berdasarkan Tabel 10, suhu *annealing* 55,5°C memiliki *band* atau pita DNA dengan intensitas paling tajam dibandingkan suhu lainnya. Sehingga, suhu *annealing* primer *mecA* yang paling optimal adalah 55,5°C.

B. Pembahasan

1. Desain primer gen *mecA* bakteri MRSA

Desain atau perancangan primer adalah langkah awal yang menentukan performa amplifikasi dari proses uji PCR. Desain primer dilakukan menggunakan metode *in silico* pada situs bioinformatika yang diawali dengan pencarian *full genome* MRSA pada *GeneBank* NCBI. Fasta dari *full genome* MRSA ([KU194301.1](#)) digunakan untuk merancang primer pada NCBI Primer-BLAST dan didapatkan 10 kandidat pasangan primer. Keberhasilan dalam melakukan desain primer pada PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan. Adapun hal yang harus diperhatikan dalam melakukan desain atau perancangan primer yaitu panjang primer, persentase *Guanine* dan *Cytosine* (%GC), suhu leleh (T_m), serta kriteria lainnya seperti nilai *self dimer*, *hairpin*, *repeat*, dan *run* yang rendah (Saraswati dkk., 2019).

Berdasarkan hasil analisis karakteristik primer, primer gen *mecA* yang digunakan adalah pasangan primer dengan primer *forward* 5'-TGGCTCAGGTACTGCTATCC-3' dan primer *reverse* 5'-TGGAAGTTGTTGAGCAGAGGT-3' yang menghasilkan ukuran produk 156 bp. Pasangan primer *mecA* memiliki panjang basa 20 bp untuk primer *forward* dan 21 bp untuk primer *reverse*. Secara teoritis, primer idealnya memiliki panjang 18 – 30 bp. Primer yang terlalu pendek akan cenderung mengalami kesalahan penempelan (*mispriming*) dan primer yang terlalu panjang memiliki potensi untuk terjadinya hibridisasi sehingga akan menghambat proses amplifikasi DNA (Praja dan Rosalina, 2021). Sehingga, panjang basa primer *mecA* memenuhi syarat panjang basa primer yang ideal.

Persentase *Guanine* dan *Cytosine* (GC) yang dimiliki oleh primer *forward* sebesar 55,00% dan primer *reverse* sebesar 47,62%. Persentase GC adalah jumlah basa guanin dan sitosin dalam suatu primer yang terkait dengan suhu leleh dan merupakan salah satu faktor penting dalam mendesain primer yang idealnya berkisar antara 40 – 60%. Persentase GC yang terlalu rendah menyebabkan primer tidak mampu menempel secara efektif pada DNA *template* dan akan berdampak terhadap penurunan efisiensi PCR. Sedangkan, persentase GC yang terlalu tinggi akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda DNA *template* (Maitriani, Wirajana dan Yowani, 2015). Berdasarkan persentase GC yang dimiliki oleh pasangan primer *mecA*, maka pasangan primer tersebut memenuhi syarat persentase GC primer yang ideal.

Suhu leleh atau *temperature melting* (T_m) sangat penting dalam proses denaturasi untai ganda DNA, idealnya berkisar antara 50 – 65°C. Primer dengan suhu leleh yang terlalu rendah tidak akan dapat bekerja pada suhu tinggi dan primer dengan suhu leleh yang terlalu tinggi cenderung mengalami *mispriming* pada suhu rendah (Anika, Putri dan Wahyuni, 2019). Pasangan primer dengan selisih suhu leleh melebihi 5°C akan menyebabkan penurunan proses amplifikasi atau bahkan tidak terjadi proses amplifikasi sama sekali (Praja dan Rosalina, 2021). Oleh karena itu, pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang tinggi. Primer *forward* memiliki suhu leleh 58,59°C dan primer *reverse* memiliki suhu leleh 59,51°C dengan selisih 0,92°C. Sehingga, pasangan primer tersebut memenuhi syarat suhu leleh primer yang ideal.

Run merupakan pengulangan urutan satu basa yang sama, seperti CCCC pada primer *reverse* 8. *Repeat* merupakan pengulangan dua basa yang sama, seperti

TATATA. Keberadaan *run* dan *repeat* pada primer akan menyebabkan *false priming* pada proses PCR. *False priming* atau kesalahan penempelan primer di luar suhu *annealing* mengakibatkan terjadinya kesalahan pembentukan produk pada suhu tertentu sehingga produk yang diperoleh tidak sesuai dengan hasil yang diinginkan (Sasmitha, Yustiantara dan Yowani, 2018). Secara umum, *run* yang ditoleransi tidak lebih dari 4 basa yang sama berturut-turut dan *repeat* yang ditoleransi tidak lebih dari 3 pola pendek berulang (Praja dan Rosalina, 2021). Pasangan primer *mecA* menunjukkan nilai *run* dan *repeat* 0, baik pada primer *forward* maupun primer *reverse*, yang menandakan bahwa tidak adanya *run* atau *repeat* pada primer *forward* maupun primer *reverse*. Maka, pasangan primer tersebut memenuhi syarat *run* dan *repeat* primer yang ideal.

Hal lain yang perlu dihindari yakni kondisi *hairpin*. *Hairpin* merupakan suatu kondisi di mana ujung primer saling berikatan. Interaksi *hairpin* pada primer sama sekali tidak diperbolehkan, karena dapat menghambat proses PCR dan menurunkan efisiensi amplifikasi (Sasmitha, Yustiantara dan Yowani, 2018). Stabilitas struktur *hairpin* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -3 kkal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan *hairpin* yang semakin stabil (Budiyanti Putri, Mulyanti dan Ega Priani, 2021). Pasangan primer *mecA* menunjukkan nilai *hairpin* 0 yang menandakan bahwa kedua ujung primer tidak saling berikatan. Sehingga, pasangan primer tersebut memenuhi syarat *hairpin* primer yang ideal.

Self dimer merupakan primer yang dapat berikatan dengan primer lain yang sejenis, yaitu primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan

primer *reverse*. Keberadaan *self dimer* merujuk pada penurunan efisiensi proses PCR (Praja dan Rosalina, 2021). Stabilitas struktur *self dimer* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -6 kkal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan *self dimer* yang semakin stabil (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Primer *forward* memiliki *self dimer* dengan energi bebas sebesar -3,65 kkal/mol dan primer *reverse* menunjukkan nilai 0 kkal/mol yang berarti tidak memiliki *self dimer*. Hal ini menunjukkan bahwa struktur sekunder *self dimer* pada kedua primer akan semakin tidak stabil dan tidak mengganggu proses penempelan primer (*annealing*) (Budiyanti Putri, Mulyanti dan Ega Priani, 2021). Sehingga, pasangan primer tersebut memenuhi syarat *self dimer* primer yang ideal.

Homodimer adalah ikatan yang terjadi pada suatu primer berikatan dengan primer itu sendiri yaitu primer *forward* dengan primer *forward* dan primer *reverse* dengan primer *reverse*. Heterodimer adalah ikatan yang terjadi pada suatu primer berikatan dengan primer pasangannya yaitu primer *forward* dan juga primer *reverse*. Stabilitas struktur homodimer dan heterodimer ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -6 kkal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan homodimer dan heterodimer yang semakin stabil (Budiyanti Putri, Mulyanti dan Ega Priani, 2021). Primer *forward mecA* memiliki homodimer dengan energi bebas sebesar -2,49 kkal/mol dan primer *reverse mecA* memiliki homodimer dengan energi bebas sebesar -2,86 kkal/mol. Kedua primer memiliki heterodimer dengan energi bebas sebesar -4,21

kkal/mol. Hasil tersebut menunjukkan nilai energi bebas yang lebih besar dari -6 kkal/mol dan dianggap tidak akan mengganggu proses amplifikasi PCR. Sehingga, pasangan primer tersebut memenuhi syarat homodimer dan heterodimer primer yang ideal.

Ukuran produk PCR juga merupakan salah satu parameter penting dalam keberhasilan reaksi amplifikasi, terutama dalam metode PCR konvensional. Produk PCR yang ideal umumnya berada dalam rentang 100 hingga 1000 pasangan basa atau *base pairs* (bp). Rentang ini dipilih karena memudahkan efisiensi reaksi, menghasilkan amplifikasi yang cepat dan spesifik, serta menurunkan risiko pembentukan struktur sekunder seperti *loop* atau *hairpin* yang dapat menghambat reaksi (Green dan Sambrook, 2012). Dalam penelitian ini, primer yang dirancang menghasilkan produk amplifikasi gen *mecA* dengan ukuran 156 bp. Ukuran tersebut termasuk dalam kategori pendek (*short fragment*) yang sangat ideal untuk PCR karena memungkinkan proses denaturasi, *annealing*, dan *extension* berlangsung lebih cepat dan efisien. Produk PCR dengan ukuran di bawah 300 bp memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk berhasil diamplifikasi menggunakan enzim Taq DNA *polymerase* standar tanpa memerlukan kondisi atau enzim khusus. Produk yang terlalu panjang (>1000 bp) dapat memperlambat proses amplifikasi, meningkatkan kebutuhan waktu ekstensi, dan menuntut penggunaan enzim DNA *polymerase* yang memiliki kemampuan *proofreading* atau ketahanan terhadap degradasi. Selain itu, fragmen panjang lebih rentan mengalami degradasi dan kesalahan amplifikasi, serta mempersulit interpretasi hasil elektroforesis gel *agarose* (Mackay, 2007). Dengan desain primer yang menghasilkan produk sepanjang 156 bp, penelitian ini telah memenuhi kriteria

panjang produk PCR yang ideal untuk deteksi gen target secara cepat, spesifik, dan efisien menggunakan metode PCR konvensional.

Setelah pasangan primer *mecA* memenuhi seluruh persyaratan dan merupakan pasangan primer terbaik yang dapat mengamplifikasi gen target karena memenuhi kriteria ideal, maka dilakukan pengujian terkait spesifisitas atau similaritas dari pasangan primer 10 pada situs NCBI Nucleotide BLAST. Hasil analisis pada primer *forward* menunjukkan bahwa primer ini memiliki kemiripan sebesar 100% dengan gen *mecA* yang terdapat pada MRSA dengan nomor akses CP173756.1, CP173757.1, CP172295.1, CP172294.1, CP172293.1, CP172291.1, CP172292.1, CP172285.1, CP172284.1, dan CP172283.1. Sama halnya dengan primer *forward*, primer *reverse* pun menunjukkan bahwa primer tersebut memiliki kemiripan sebesar 100% dengan gen *mecA* yang terdapat pada MRSA dengan nomor akses CP173756.1, CP173757.1, CP172295.1, CP172294.1, CP172293.1, CP172291.1, CP172292.1, CP172285.1, CP172284.1, dan CP172283.1. Primer yang dirancang secara *in silico* idealnya harus dioptimasi pada tingkat laboratorium untuk memperoleh kondisi yang optimal. Optimasi yang harus dilakukan meliputi *annealing temperature* (T_a) untuk mencapai hasil PCR yang optimal (Sasmitha, Yustiantara dan Yowani, 2018). Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan optimasi metode PCR menggunakan primer gen *mecA* yang telah dirancang.

2. Hasil optimasi PCR dan hasil identifikasi gen *mecA*

Identifikasi gen *mecA* bakteri MRSA dengan optimasi metode PCR dan desain primer spesifik dilakukan pada isolat bakteri MRSA ATCC 33591 yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan diremajakan di Laboratorium Terpadu Bakteriologi dan Biologi

Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar. Bakteri ATCC merupakan spesimen kultur mikroba yang dikumpulkan, dipelihara, dan didistribusikan oleh *American Type Culture Collection* (ATCC) yang merupakan organisasi non-profit yang bertujuan untuk menyediakan sumber daya mikroba untuk kepentingan penelitian dan industri. Koloni bakteri diremajakan menggunakan *Tryptic Soy Broth* (TSB) kemudian dibuat suspensi dengan NaCl steril dan dilakukan ekstraksi DNA dengan metode *Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol* (PCIA).

Media *Tryptic Soy Broth* (TSB) merupakan media umum yang digunakan untuk isolasi pertumbuhan mikroorganisme yang telah diperkaya berbagi nutrisi sehingga dapat mendorong pertumbuhan mikroorganisme menjadi lebih teliti dan beragam. Komposisi dari media TSB adalah 20 g/L pepton, 2,5 g/L glukosa, 5 g/L NaCl dan 2,5 g/L K₂HPO₄ (Suprpto, Sudarno dan Tito, 2016). Media TSB dipilih untuk meremajakan bakteri MRSA karena kandungan pepton (*casein* dan *soybean meal digest*) berperan sebagai sumber nitrogen dan asam amino, glukosa berperan sebagai sumber energi, dan NaCl yang berperan menjaga tekanan osmotik yang sesuai untuk bakteri. Media TSB merupakan media cair yang memungkinkan bakteri menyebar dan berkembang secara merata, sehingga ketika dipindahkan ke media padat atau digunakan untuk pengujian lebih lanjut, diperoleh hasil kultur bakteri yang aktif dan seragam. Pemilihan metode PCIA sebagai metode ekstraksi DNA dikarenakan metode ini merupakan *gold standard* dalam ekstraksi DNA yang dapat digunakan untuk sampel darah, kultur suspensi, atau homogenat jaringan. Sampel DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan metode konvensional lainnya dengan biaya yang relatif terjangkau (Dairawan dan Shetty, 2020).

Dalam ekstraksi DNA, penilaian kualitas dan kuantitas umumnya dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer seperti NanoDrop. Alat ini memberikan informasi mengenai konsentrasi DNA (ng/ μ L) serta kemurniannya berdasarkan rasio A260/A280. Rasio ideal untuk DNA murni adalah sekitar 1,8 – 2,0 yang menunjukkan minimnya kontaminan seperti protein atau fenol (Kusumawati dkk., 2023). Namun, dalam penelitian ini, analisis kuantitatif tidak dilakukan dengan NanoDrop, dan sebagai gantinya dilakukan analisis kualitas DNA secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel *agarose*. Teknik ini memungkinkan visualisasi langsung terhadap kondisi fisik DNA, termasuk keberadaan DNA dalam sampel, integritasnya (utuh atau terfragmentasi), dan indikasi adanya degradasi atau kontaminasi (Sambrook dan Russell, 2001).

Hasil ekstraksi DNA dinilai layak digunakan apabila pada gel elektroforesis terlihat pita DNA yang tegas dan utuh, tanpa adanya *smear* atau pecahan acak yang menunjukkan degradasi. Meskipun tidak menyediakan angka pasti konsentrasi DNA, metode ini telah banyak digunakan dalam penelitian berbasis PCR untuk memastikan bahwa DNA *template* dapat berfungsi sebagai substrat amplifikasi (Green dan Sambrook, 2012). Oleh karena itu, analisis hasil ekstraksi DNA melalui elektroforesis dinilai cukup untuk mendukung keperluan optimasi PCR, terutama jika fokus penelitian berada pada tahap optimasi primer dan suhu *annealing*, bukan kuantifikasi ekspresi atau analisis lanjutan berbasis qPCR. Penggunaan elektroforesis sebagai metode verifikasi ini juga memadai karena amplifikasi PCR hanya membutuhkan jumlah DNA dalam kisaran nanogram per reaksi, dan DNA murni hasil ekstraksi sederhana umumnya sudah mencukupi untuk tujuan tersebut. Dengan melihat keberhasilan amplifikasi produk target

yakni gen *mecA* berukuran 156 bp dalam PCR selanjutnya, dapat disimpulkan bahwa kualitas DNA sudah sesuai meskipun tidak dilakukan pengukuran kuantitatif dengan spektrofotometri.

Hasil ekstraksi DNA dianalisis secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1,5% dengan tegangan 77 volt selama 60 menit. Berdasarkan Gambar 3, terlihat pendaran menyerupai pita DNA pada *well* gel *agarose*. Terdapat beberapa kemungkinan penyebab hasil ekstraksi hanya berendar pada *well* setelah proses elektroforesis. Pertama, *overloading* DNA. Memuat DNA dalam jumlah berlebihan ke dalam gel *agarose* dapat menyebabkan DNA tetap berada di *well* tanpa migrasi. Hal ini disebabkan oleh viskositas tinggi dan konsentrasi DNA yang terlalu pekat, sehingga menghambat pergerakan DNA melalui matriks gel. Kedua, ukuran DNA yang terlalu besar. DNA genomik yang sangat besar, terutama jika tidak terfragmentasi, dapat kesulitan bermigrasi melalui gel *agarose*. Fragmen DNA berukuran besar memerlukan konsentrasi gel yang lebih rendah atau perlakuan khusus untuk memastikan migrasi yang efektif. Ketiga, kontaminasi sisa fenol atau protein. Proses ekstraksi DNA menggunakan fenol-kloroform dapat meninggalkan residu fenol atau protein jika tidak dibersihkan dengan sempurna. Residu ini dapat membentuk kompleks dengan DNA, meningkatkan berat molekulnya, dan menghambat migrasi selama elektroforesis. Keempat, kepadatan sel yang tinggi. Menggunakan suspensi bakteri dengan kepadatan tinggi dapat menghasilkan DNA dalam jumlah besar, tetapi juga meningkatkan risiko kontaminasi dengan debris seluler dan protein. Hal ini dapat mengganggu kemurnian DNA dan menghambat migrasi selama elektroforesis.

Untuk memastikan bahwa hasil ekstraksi mengandung DNA bakteri, dilakukan PCR *internal control* dengan primer gen 16s rRNA untuk menguji keberadaan gen 16s rRNA pada DNA sampel. Gen 16s rRNA merupakan gen yang dapat ditemukan pada semua bakteri. Oleh karena itu, pengujian gen 16s rRNA dilakukan untuk memeriksa apakah dalam hasil ekstraksi terdapat DNA bakteri atau tidak. Hasil PCR *internal control* dapat dilihat pada Gambar 4. Didapatkan hasil positif pada kedua sampel yang ditunjukkan dengan adanya *band* pada ukuran 1.550 bp. Dengan demikian, hasil ekstraksi terbukti mengandung DNA bakteri dan dapat dilanjutkan pada tahap optimasi PCR menggunakan primer *mecA* yang telah dirancang.

Reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terdiri dari tiga tahapan utama yang diulang dalam sejumlah siklus, yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension*, serta diakhiri dengan tahap *final extension* dan *holding*. Setiap tahap memiliki suhu ideal yang berperan penting dalam keberhasilan amplifikasi DNA. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu tinggi, sekitar 94 – 95°C, dengan tujuan memisahkan dua untai DNA menjadi untai tunggal. Pada awal reaksi biasanya dilakukan denaturasi awal selama 2 – 5 menit, diikuti oleh denaturasi selama 30 detik pada setiap siklus. Tahap selanjutnya adalah *annealing*, di mana primer menempel pada sekuens target di DNA *template*. Suhu *annealing* bervariasi antara 50 – 65°C dan sangat bergantung pada temperatur leleh (T_m) dari primer yang digunakan, umumnya diatur 3–5°C di bawah T_m . Suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel secara tidak spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi bisa menghambat penempelan primer (Green dan Sambrook, 2012).

Pada penelitian ini, optimasi PCR dilakukan dengan memvariasikan suhu *annealing* untuk menentukan suhu paling efisien dalam amplifikasi gen *mecA* dengan ukuran fragmen target sebesar 156 bp. Optimasi PCR dilakukan sebanyak dua kali menggunakan PCR *gradient*. Pada optimasi pertama, suhu *annealing* diatur pada 51,0°C dengan *gradient increase* 1,0°C. Didapatkan variasi suhu mulai dari 47,5°C, 47,7°C, 48,2°C, 49,0°C, 50,0°C, 51,0°C, 52,1°C, 53,1°C, 54,1°C, 54,9°C, 55,4°C, dan 55,6°C. Pada optimasi kedua, suhu *annealing* diatur pada 59,0°C dengan *gradient increase* 1,0°C. Didapatkan variasi suhu mulai dari 55,5°C, 55,7°C, 56,2°C, 57,0°C, 58,0°C, 59,0°C, 60,1°C, 61,1°C, 62,1°C, 62,9°C, 63,4°C, dan 63,6°C.

Tahap ketiga adalah *extension* yang dilakukan pada suhu 72°C, yaitu suhu optimal bagi kerja enzim Taq DNA *polymerase*. Pada tahap ini, enzim menambahkan nukleotida ke ujung 3' primer untuk membentuk untai DNA baru. Waktu ekstensi biasanya disesuaikan dengan panjang produk PCR, dengan rata-rata 1 menit untuk setiap 1000 bp. Setelah semua siklus selesai, dilakukan tahap *final extension* pada suhu 72°C selama 5 – 10 menit untuk memastikan seluruh produk PCR telah teramplifikasi secara sempurna. Reaksi PCR biasanya diakhiri dengan tahap *holding* pada suhu 4°C untuk menjaga stabilitas produk hingga dianalisis lebih lanjut (Green dan Sambrook, 2012). Dengan penyesuaian suhu yang tepat pada setiap tahap, PCR dapat menghasilkan amplifikasi DNA yang efisien, spesifik, dan dapat direproduksi dengan baik.

Hasil optimasi PCR selanjutnya dianalisis secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1,5% dengan tegangan 77 volt selama 60 menit. Hasil elektroforesis pada Gambar 5 menunjukkan bahwa pasangan primer *mecA* dengan

primer *forward* 5'-TGGCTCAGGTACTGCTATCC-3' dan primer *reverse* 5'-TGGAACCTTGTGAGCAGAGGT-3' telah berhasil mengamplifikasi gen *mecA* pada isolat MRSA ATCC 33591 yang menghasilkan ukuran produk 156 bp sesuai dengan hasil analisis secara *in silico*. *Band* atau pita DNA yang sesuai dengan ukuran target tampak pada seluruh sampel, namun dengan intensitas yang bervariasi. Hasil observasi pada Tabel 10 menunjukkan bahwa suhu *annealing* 55,5°C (sampel 13) menghasilkan pita paling tajam dan intens yang menandakan efisiensi amplifikasi yang optimal. Secara teoritis, suhu *annealing* optimal berada 3 – 5°C di bawah rata-rata suhu leleh primer. Berdasarkan suhu leleh primer *forward* (58,59°C) dan primer *reverse* (59,51°C), suhu *annealing* optimal berada pada kisaran 54 – 56°C. Hasil visualisasi pita DNA pada gel *agarose* mendukung hal ini, karena suhu 55,5°C menunjukkan amplifikasi paling efisien dengan intensitas pita DNA paling tajam dan sesuai ukuran target 156 bp.

Di bawah suhu tersebut, yakni pada suhu 47,5°C (sampel 1) hingga 55,4°C (sampel 11), pita masih tampak namun cenderung *smear* dan redup, yang mengindikasikan efisiensi amplifikasi yang rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya *mismatch* atau ikatan non-spesifik primer akibat suhu yang terlalu rendah. Sebaliknya, pada suhu *annealing* yang lebih tinggi yaitu pada suhu 55,6°C (sampel 12) hingga 63,6°C (sampel 24) intensitas pita cenderung menurun secara bertahap, bahkan hampir tidak tampak pada suhu 63,6°C (sampel 24). Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada DNA *template*, sehingga reaksi amplifikasi tidak berlangsung secara optimal. Hasil ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* sangat mempengaruhi efisiensi dan spesifisitas reaksi PCR. Dengan menggunakan suhu

annealing yang tepat, diharapkan hasil PCR menjadi lebih akurat, spesifik, dan efisien, sehingga dapat digunakan dalam aplikasi molekuler selanjutnya seperti sekuensing, kloning, atau deteksi klinis.

Penelitian terdahulu oleh Mindhumalid (2018) telah berhasil melakukan identifikasi gen *mecA* pada bakteri MRSA menggunakan metode PCR terhadap empat isolat *S. aureus* yang berasal dari sampel klinis serta isolat *S. aureus* ATCC 25923 sebagai kontrol negatif. Berdasarkan hasil PCR dengan elektroforesis gel *agarose*, didapatkan hasil tiga isolat dengan kode Sa1, Sa2, dan Sa3 yang menghasilkan pita DNA berukuran 533 bp serta satu isolat dengan kode Sa4 dan isolat *S. aureus* ATCC 25923 tidak menghasilkan pita DNA. Hal ini menandakan bahwa isolat Sa1, Sa2, dan Sa3 memiliki gen *mecA* dan merupakan MRSA, sedangkan isolat Sa4 tidak memiliki gen *mecA* dan merupakan *S. aureus*. Pada penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa *S. aureus* tidak memiliki gen *mecA* yang ditandai oleh isolat *S. aureus* ATCC 25923 tidak menghasilkan pita DNA pada hasil elektroforesis.

Penelitian terdahulu oleh Syamsidi dkk., (2021) telah berhasil merancang primer yang spesifik terhadap gen *mecA* pada bakteri MRSA, yaitu primer *forward* 5'-GTGAAGCAACCATCGTTAC-'3 dengan panjang 19 bp dan primer *reverse* 5'-CCTTCTACACCTCCATATCAC-'3 dengan panjang 21 bp yang sesuai dengan syarat panjang primer yang ideal. Namun, produk yang dihasilkan berukuran 2008 bp yang melebihi syarat ukuran produk ideal yakni 100 – 1000 bp. Hal ini dapat memperlambat proses amplifikasi, meningkatkan kebutuhan waktu ekstensi, dan menuntut penggunaan enzim DNA *polymerase* yang memiliki kemampuan *proofreading* atau ketahanan terhadap degradasi. Selain itu, fragmen

panjang lebih rentan mengalami degradasi dan kesalahan amplifikasi, serta mempersulit interpretasi hasil elektroforesis gel *agarose* (Mackay, 2007). Maka, primer yang dihasilkan tidak memenuhi syarat ukuran produk yang ideal. Jika dibandingkan, primer yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki ukuran produk yang jauh lebih kecil yakni 156 bp yang memenuhi syarat ukuran produk ideal. Sehingga, primer yang dihasilkan pada penelitian ini akan lebih memudahkan efisiensi reaksi, menghasilkan amplifikasi yang cepat dan spesifik, serta menurunkan risiko pembentukan struktur sekunder seperti *loop* atau *hairpin* yang dapat menghambat reaksi (Green dan Sambrook, 2012).

Analisis karakteristik pada Oligoanalyzer pasangan primer tersebut menunjukkan bahwa primer forward memiliki persentase GC sebesar 47,4% dan primer reverse sebesar 47,6% yang sesuai dengan syarat persentase GC primer yang ideal. Akan tetapi, suhu leleh atau *temperature melting* (T_m) pada primer *forward* sebesar 51,5°C dan primer *reverse* sebesar 52°C menunjukkan suhu yang cukup rendah walaupun masih berada dalam rentang ideal suhu leleh primer yaitu 50 – 65°C. Hal ini tentu akan berpengaruh pada penentuan suhu *annealing*, di mana suhu *annealing* optimal biasanya berada 3 – 5°C di bawah suhu leleh. Dengan suhu leleh primer demikian maka perkiraan suhu *annealing* optimal berada pada rentang 46 – 48°C, sedangkan suhu tersebut berada di bawah suhu leleh ideal. Sehingga, besar kemungkinan terjadi *mismatch* atau ikatan non-spesifik primer akibat suhu yang terlalu rendah.

Analisis karakteristik struktur sekunder pada Oligoanalyzer pasangan primer tersebut menunjukkan bahwa primer *forward* memiliki *hairpin* dengan energi bebas sebesar -0,1 kkal/mol dan primer *reverse* memiliki *hairpin* dengan energi

bebas sebesar -0,0025 kkal/mol. Walaupun nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi lebih besar dari -3 kkal/mol, interaksi *hairpin* pada primer sama sekali tidak diperbolehkan karena dapat menghambat proses PCR dan menurunkan efisiensi amplifikasi (Sasmitha, Yustiantara dan Yowani, 2018). Selain itu, primer *forward* memiliki *self dimer* dengan energi bebas sebesar -3,61 kkal/mol dan heterodimer dengan energi bebas sebesar -1,95 kkal/mol. Sedangkan, primer *reverse* memiliki *self dimer* dengan energi bebas sebesar -5,38 kkal/mol dan heterodimer dengan energi bebas sebesar -4,74 kkal/mol. Nilai *self dimer* dan heterodimer pada kedua primer tersebut memang masih dapat ditoleransi karena lebih besar dari -6 kkal/mol. Namun, nilai energi bebas *self dimer* dan heterodimer primer yang dihasilkan pada penelitian ini jauh lebih kecil, sehingga lebih optimal dan tidak akan mengganggu amplifikasi PCR dibandingkan primer yang dirancang oleh penelitian terdahulu. Di samping itu, desain primer yang dilakukan oleh Syamsidi dkk., (2021) belum sampai ke tahap PCR, sehingga belum diketahui secara pasti sensitivitas dan spesifisitas dari primer yang telah dihasilkan. Sedangkan, pada penelitian ini desain primer telah dilanjutkan hingga pada tahap optimasi PCR, sehingga telah diketahui secara pasti sensitivitas dan spesifisitas dari primer yang dirancang.

Pada penelitian ini, metode PCR diuji untuk mendeteksi gen *mecA* bakteri MRSA secara spesifik dan didapatkan hasil terbentuknya produk hasil PCR dengan ukuran ampikon yang sesuai dengan karakteristik primer yang didesain dalam penelitian ini. Dengan demikian, metode PCR menggunakan desain primer spesifik dapat digunakan sebagai deteksi gen *mecA* bakteri MRSA.