

SKRIPSI

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN *blaSHV*
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae***



**Kemenkes
Poltekkes Denpasar**

Oleh :

IDA AYU NIA PARAMITA

NIM. P07134222050

**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
POLTEKKES KEMENKES DENPASAR
JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
PRODI SARJANA TERAPAN
DENPASAR
2026**

SKRIPSI

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN *blaSHV*
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae***

**Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Menyelesaikan Pendidikan Sarjana Terapan
Jurusan Teknologi Laboratorium Medis**

Oleh :

**IDA AYU NIA PARAMITA
NIM. P07134222050**

**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
POLTEKKES KEMENKES DENPASAR
JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
PRODI SARJANA TERAPAN
DENPASAR
2026**

LEMBAR PERSETUJUAN

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN blaSHV
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae***

Oleh :

IDA AYU NIA PARAMITA
NIM. P07134222050

TELAH MENDAPATKAN PERSETUJUAN

Pembimbing Utama :



Burhannuddin, S.Si., M.Biomed
NIP. 198602282009121003

Pembimbing Pendamping :



I Gusti Ayu Sri Dhyana Putri, S.KM., M.PH
NIP. 197209011998032003

MENGETAHUI
KETUA JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
POLTERKES KEMENKES DENPASAR



I Gusti Ayu Sri Dhyana Putri, S.KM., M.PH
NIP. 197209011998032003

SKRIPSI DENGAN JUDUL

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN *blaSHV*
BAKTERI *Klebsiella pneumoniae***

Oleh :
IDA AYUNIA PARAMITA
NIM. P07134222050

**TELAH DIUJI DIHADAPAN TIM PENGUJI
PADA HARI : SENIN
TANGGAL : 27 APRIL 2026**

TIM PENGUJI :

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---------|
| 1. Nyoman Mastra, S.KM., S.Pd., M.Si | (Ketua Penguji) | (.....) |
| 2. Ida Bagus Oka Suyasa, S.Si., M.Si | (Anggota Penguji 1) | (.....) |
| 3. Dr. I Wayan Karta, S.Pd., M.Si | (Anggota Penguji 2) | (.....) |

**MENGETAHUI
KETUA JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
POLTEKKES KEMENKES DENPASAR**


I Gusti Ayu Sri Dhyana Putri, S.KM., M.P.H.
NIP. 197209011998032003

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ida Ayu Nia Paramita

NIM : P07134222050

Program Studi : Sarjana Terapan

Jurusan : Teknologi Laboratorium Medis

Tahun Akademik : 2025/2026

Alamat : Br. Pemijian, Desa Sangreh, Kec. Abiansemal, Kab. Badung

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi dengan judul Desain Primer Dan Optimasi Metode *Polymerase Chain Reaction* Untuk Deteksi Gen blaSHV Bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah **benar karya sendiri atau bukan plagiat hasil karya orang lain**
2. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa Skripsi ini bukan karya saya sendiri atau plagiat hasil karya orang lain, maka saya sendiri bersedia menerima sanksi sesuai Peraturan Mendiknas RI No. 17 Tahun 2010 tentang Pencegahan dan Penanggulangan Plagiat di Perguruan Tinggi dan ketentuan perundang-undangan yang berlaku.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Denpasar, 21 April 2026

Yang membuat pernyataan



Ida Ayu Nia Paramita
NIM. P07134222050

LEMBAR PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur ke hadapan Ida Sang Hyang Widhi Wasa, karya ini dipersembahkan sebagai wujud perjalanan, perjuangan, dan pembelajaran yang tidak selalu mudah, namun selalu bermakna.

Karya ini juga dipersembahkan kepada kedua orang tua saya yang senantiasa memberikan doa, dukungan, dan pengorbanan tanpa henti. Kepada kedua saudara saya, yang selalu menghadirkan semangat serta kebersamaan dalam setiap langkah yang ditempuh.

Tidak lupa kepada teman-teman yang telah memberikan motivasi, bantuan, serta kebersamaan selama proses perjalanan hidup saya, sehingga setiap tantangan dapat dilalui dengan lebih ringan.

Serta kepada seseorang yang kehadirannya memberi arti lebih dalam perjalanan ini, yang tanpa banyak kata mampu menghadirkan semangat, ketenangan, dan alasan untuk terus bertahan serta melangkah maju.

Setiap proses yang dilalui menjadi pengingat bahwa keberhasilan tidak datang secara instan, melainkan melalui kesabaran, ketekunan, dan keberanian untuk terus melangkah meski dalam keraguan. Kegagalan bukanlah akhir, melainkan bagian dari perjalanan menuju pemahaman yang lebih baik.

Motivasi terbesar saya dalam menyelesaikan karya ini adalah keyakinan bahwa setiap usaha yang dilakukan dengan sungguh-sungguh, disertai doa dan ketulusan, akan memberikan hasil yang sepadan. Tidak ada langkah yang sia-sia selama terus bergerak maju dan tidak menyerah pada keadaan.

Akhir kata, semoga karya ini dapat memberikan manfaat, menambah wawasan, serta menjadi bagian kecil dari perjalanan panjang menuju cita-cita yang lebih tinggi, atas berkat dan tuntunan Ida Sang Hyang Widhi Wasa.

RIWAYAT PENULIS



Penulis bernama Ida Ayu Nia Paramita yang akrab disapa Dayu Nia, dilahirkan di Abiansemal pada tanggal 9 Juli 2004 dari Ayah Ida Bagus Agung Adi Wirawan dan Ibu Ida Ayu Dursariasih. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara. Penulis memulai pendidikan formal di SD Negeri 3 Sangeh pada tahun 2011-2016, kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Petang pada tahun 2016-2019, dan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 2 Abiansemal pada tahun 2019-2022. Pada tahun 2022, penulis menyelesaikan pendidikan di Sekolah Menengah Atas dan melanjutkan pendidikan ke jenjang Perguruan Tinggi di Poltekkes Kemenkes Denpasar pada program studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis.

**PRIMER DESIGN AND OPTIMIZATION OF POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR) METHOD FOR DETECTION OF THE *blaSHV* GENE
IN *Klebsiella pneumoniae***

ABSTRACT

Antibiotic resistance mediated by the *blaSHV* gene in *Klebsiella pneumoniae* represents a major challenge in bacterial infection management. Therefore, a specific and sensitive molecular detection method is required. This study aimed to design specific primers for the *blaSHV* gene using an in silico approach and to optimize PCR conditions for its detection. The methods included primer design using NCBI Primer-BLAST, secondary structure analysis with NetPrimer, validation using Benchling and BLAST, and in vitro testing using PCR with DNA extracted by the PCIA method. The results obtained 10 candidate primer pairs with optimal parameters, with primer pair number 10 identified as the best (forward: 5'-TGTCGCTTCTTTACTCGCCT-3'; reverse: 5'-TCTATCATGCCTACGCTGCC-3') producing a 184 bp amplicon. PCR optimization revealed an optimal annealing temperature of 59.1°C, producing clear and specific DNA bands. Specificity testing showed amplification only in *Klebsiella pneumoniae* and not in *Escherichia coli*. In conclusion, the designed primers demonstrated high specificity, and the optimized PCR conditions effectively detected the *blaSHV* gene accurately.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; *blaSHV*; Primer Design.

DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN *blaSHV* BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRAK

Resistensi antibiotik yang dimediasi oleh gen *blaSHV* pada *Klebsiella pneumoniae* menjadi salah satu tantangan utama dalam penanganan infeksi bakteri. Oleh karena itu, diperlukan metode deteksi molekuler yang spesifik dan sensitif. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik gen *blaSHV* secara *in silico* serta mengoptimasi kondisi PCR untuk deteksinya. Metode penelitian meliputi desain primer menggunakan NCBI Primer-BLAST, analisis struktur sekunder dengan NetPrimer, validasi menggunakan Benchling dan BLAST, serta uji *in vitro* melalui PCR menggunakan DNA hasil ekstraksi metode PCIA. Hasil menunjukkan diperolehnya 10 kandidat primer dengan parameter optimal, dan primer terbaik adalah primer ke-10 (*forward*: 5'-TGTCGCTTCTTTACTCGCCT-3'; *reverse*: 5'-TCTATCATGCCTACGCTGCC-3') dengan produk 184 bp. Optimasi PCR menunjukkan suhu annealing optimal pada 59,1°C dengan pita DNA yang jelas dan spesifik. Uji spesifisitas menunjukkan amplifikasi hanya terjadi pada *Klebsiella pneumoniae* dan tidak pada *Escherichia coli*. Disimpulkan bahwa primer yang dirancang memiliki spesifisitas tinggi dan kondisi PCR yang dioptimasi mampu mendeteksi gen *blaSHV* secara akurat.

Kata kunci: *Klebsiella pneumoniae*; *blaSHV*; desain primer.

RINGKASAN PENELITIAN

DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* UNTUK DETEKSI GEN *blaSHV* BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*

Oleh; Ida Ayu Nia Paramita

(P07134222050)

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu masalah kesehatan yang signifikan, terutama karena meningkatnya kasus resistensi terhadap antibiotik β -laktam. Salah satu mekanisme utama resistensi tersebut adalah produksi enzim *Extended-Spectrum β -Lactamase* (ESBL), yang mampu menghidrolisis berbagai antibiotik golongan β -laktam. Gen *blaSHV* merupakan salah satu gen penyandi enzim β -laktamase yang berperan penting dalam fenomena resistensi ini. Keberadaan gen *blaSHV* pada isolat bakteri klinis dapat menyebabkan kegagalan terapi antibiotik, sehingga diperlukan metode deteksi yang cepat, akurat, dan spesifik. Metode konvensional seperti kultur bakteri membutuhkan waktu yang relatif lama, sehingga pendekatan molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menjadi alternatif yang lebih efisien. Namun, keberhasilan PCR sangat dipengaruhi oleh kualitas desain primer dan kondisi reaksi yang optimal. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik gen *blaSHV* secara *in silico* serta mengoptimasi metode PCR untuk mendeteksi gen tersebut pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi spesifisitas primer yang dihasilkan melalui pendekatan *in silico* dan *in vitro*, sehingga dapat diperoleh primer yang benar-benar akurat dan dapat digunakan dalam deteksi molekuler.

Metode penelitian yang digunakan terdiri dari beberapa tahapan utama. Tahap pertama adalah desain primer secara *in silico* menggunakan NCBI Primer-BLAST dengan memanfaatkan data sekuens gen *blaSHV* dari database GenBank. Parameter yang diperhatikan dalam desain primer meliputi panjang primer, suhu leleh (T_m), kandungan GC, serta ukuran produk PCR. Selanjutnya, dilakukan analisis struktur sekunder menggunakan NetPrimer untuk mengevaluasi potensi pembentukan hairpin, self-dimer, serta run dan repeat yang dapat memengaruhi efisiensi PCR.

Primer terbaik kemudian divalidasi kembali menggunakan Benchling untuk memastikan kesesuaian parameter desain secara menyeluruh. Uji spesifisitas primer dilakukan menggunakan BLAST untuk memastikan bahwa primer hanya menempel pada gen target dan tidak mengalami amplifikasi silang dengan organisme lain.

Tahap berikutnya adalah pengujian secara *in vitro*. DNA bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 diekstraksi menggunakan metode *Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol* (PCIA). Hasil ekstraksi kemudian dianalisis secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa dan secara kuantitatif menggunakan NanoDrop untuk mengetahui konsentrasi serta tingkat kemurnian DNA. Setelah diperoleh DNA dengan kualitas yang baik, dilakukan optimasi PCR menggunakan metode gradient PCR untuk menentukan suhu annealing yang paling optimal. Proses PCR dilakukan dengan variasi suhu annealing untuk melihat kondisi terbaik dalam menghasilkan amplifikasi yang spesifik. Hasil PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel untuk mengamati keberadaan pita DNA sesuai ukuran target. Selain itu, dilakukan uji spesifisitas menggunakan bakteri pembanding yaitu *Escherichia coli* untuk memastikan bahwa primer hanya mengamplifikasi gen blaSHV pada *Klebsiella pneumoniae*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 10 kandidat primer yang dirancang, seluruh primer telah memenuhi parameter dasar desain primer yang baik, yaitu panjang 20 bp, nilai T_m berkisar antara 59,40–60,53°C, dan kandungan GC sebesar 50–60%. Berdasarkan analisis struktur sekunder menggunakan NetPrimer, pasangan primer nomor 10 dipilih sebagai primer terbaik karena tidak menunjukkan pembentukan hairpin dan memiliki nilai self-dimer dalam batas toleransi. Primer ini memiliki urutan forward 5'-TGTCGCTTCTTTACTCGCCT-3' dan reverse 5'-TCTATCATGCCTACGCTGCC-3', dengan ukuran produk PCR sebesar 184 bp. Validasi menggunakan Benchling menunjukkan bahwa primer tersebut memenuhi seluruh kriteria desain primer yang optimal. Hasil uji BLAST juga menunjukkan tingkat kesamaan 100% terhadap gen blaSHV pada *Klebsiella pneumoniae*, yang menandakan spesifisitas yang sangat tinggi.

Pada tahap *in vitro*, hasil ekstraksi DNA menunjukkan pita DNA yang jelas pada elektroforesis gel, serta konsentrasi DNA sebesar 141,8 ng/μL dengan rasio

A260/A280 sebesar 1,93 yang menunjukkan kemurnian tinggi. Hasil optimasi PCR menunjukkan bahwa suhu annealing optimal berada pada 59,1°C, yang menghasilkan pita DNA paling jelas dan tajam sesuai ukuran target 184 bp. Pada suhu yang lebih rendah atau lebih tinggi, terbentuk pita smear atau pita redup yang menunjukkan amplifikasi non-spesifik. Uji spesifisitas menunjukkan bahwa pita DNA hanya muncul pada sampel *Klebsiella pneumoniae* dan tidak pada *Escherichia coli*, yang mengonfirmasi bahwa primer memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen target.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa desain primer secara *in silico* yang dikombinasikan dengan analisis struktur sekunder dan validasi bioinformatika mampu menghasilkan primer yang spesifik dan efisien. Selain itu, optimasi kondisi PCR, khususnya suhu annealing, merupakan faktor penting dalam menentukan keberhasilan amplifikasi DNA secara spesifik. Primer yang dihasilkan dalam penelitian ini terbukti mampu mendeteksi gen blaSHV secara akurat pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*, baik secara *in silico* maupun *in vitro*. Sebagai saran, penelitian ini masih merupakan tahap awal sehingga perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut. Peneliti selanjutnya disarankan untuk mengaplikasikan metode PCR kuantitatif (qPCR) untuk mengetahui tingkat ekspresi atau jumlah relatif gen blaSHV secara *real-time*. Selain itu, pengujian primer pada berbagai isolat klinis juga perlu dilakukan untuk mengevaluasi performa primer dalam kondisi yang lebih kompleks. Pengembangan metode ini diharapkan dapat mendukung diagnosis molekuler yang lebih cepat dan akurat dalam mendeteksi bakteri resisten antibiotik, sehingga dapat membantu dalam pengambilan keputusan terapi yang lebih tepat.

Daftar bacaan: 40 (tahun 2001-2026)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Desain Primer Dan Optimasi Metode *Polymerase Chain Reaction* Untuk Deteksi Gen blaSHV Bakteri *Klebsiella pneumoniae*” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk menyelesaikan mata kuliah skripsi program studi Sarjana Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Tersusunnya skripsi ini tentunya tidak lepas dari berbagai pihak yang telah memberikan bantuan secara materil maupun moril, baik secara langsung maupun tidak langsung, oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Sri Rahayu, S.Tr.Keb., S.Kep., Ners., M.Kes, selaku Direktur Poltekkes Kemenkes Denpasar yang telah memberikan kesempatan dalam menempuh pendidikan di Poltekkes Denpasar, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Program Studi Sarjana Terapan.
2. Ibu I Gusti Ayu Sri Dhyanaputri, S.KM., M.P.H, selaku Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis serta pembimbing pendamping yang telah memberikan kesempatan dan kemudahan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi.
3. Bapak Heri Setiyo Bakti, S.ST., M.Biomed, selaku Ketua Program Studi Sarjana Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis atas dukungan dalam proses pembelajaran.
4. Bapak Burhannuddin, S.Si., M.Biomed, selaku pembimbing utama yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, pikiran untuk memberikan dukungan pengetahuan, membimbing dan mengarahkan penulis.

5. Bapak – bapak dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji serta memberikan saran dan masukan yang sangat berharga.
6. Seluruh pihak yang telah membantu dari awal proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, segala kritik dan saran sangat diharapkan demi pengembangan penelitian di masa mendatang.

Denpasar, 21 April 2026

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG	
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN.....	vi
RIWAYAT PENULIS.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
ABSTRAK.....	ix
RINGKASAN PENELITIAN.....	x
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	6
C. Tujuan Penelitian.....	6
D. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
A. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
B. Gen β -Lactamase Sulphydryl Variabel (blaSHV).....	11

C. <i>Extended-Spectrum β-Lactamase</i> (ESBL).....	12
D. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14
E. Desain Primer.....	16
F. Perangkat Lunak Perancangan Primer	20
BAB III KERANGKA KONSEP.....	24
A. Kerangka Konsep.....	24
B. Variabel dan Definisi Operasional	26
BAB IV METODE PENELITIAN.....	27
A. Jenis Penelitian.....	27
B. Alur Penelitian.....	27
C. Tempat dan Waktu Penelitian	28
D. Unit Analisis.....	28
E. Prosedur Kerja.....	29
F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data	42
G. Pengolahan dan Analisis Data.....	44
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	46
A. Hasil Penelitian.....	46
B. Pembahasan.....	56
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	68
A. Simpulan.....	68
B. Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Definisi Operasional	26
Tabel 2 Komposisi Reaksi PCR	37
Tabel 3 Optimasi PCR Pertama.....	38
Tabel 4 Optimasi PCR Kedua	38
Tabel 5 Hasil Perancangan Primer pada NCBI Primer-BLAST	46
Tabel 6 Karakteristik Struktur Sekunder Kandidat Primer pada NetPrimer	48
Tabel 7 Karakteristik Primer blaSHV	49
Tabel 8 Hasil NCBI Nucleotide BLAST Primer Forward blaSHV	50
Tabel 9 Hasil NCBI Nucleotide BLAST Primer Reverse blaSHV	51
Tabel 10 Hasil Analisis Pita DNA Gen blaSHV	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Bakteri <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	8
Gambar 2 Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> Pada Media <i>Mac Conkey Agar</i>	10
Gambar 3 Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada pemeriksaan gram.....	10
Gambar 4 Kerangka Konsep Penelitian.....	24
Gambar 5 Alur Penelitian.....	27
Gambar 6 Hasil ekstraksi DNA.....	52
Gambar 7 Hasil Optimasi PCR Pertama	54
Gambar 8 Hasil Optimasi PCR Kedua	54
Gambar 9 Hasil PCR <i>K.pneumoniae</i> dan <i>E.coli</i>	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Etika Penelitian	74
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian	76
Lampiran 3 Hasil Uji Plagiasi	80
Lampiran 4 Sertifikat Hasil Pengujian	82
Lampiran 5 Bimbingan Siak.....	84
Lampiran 6 Surat Pernyataan Persetujuan Publikasi.....	85