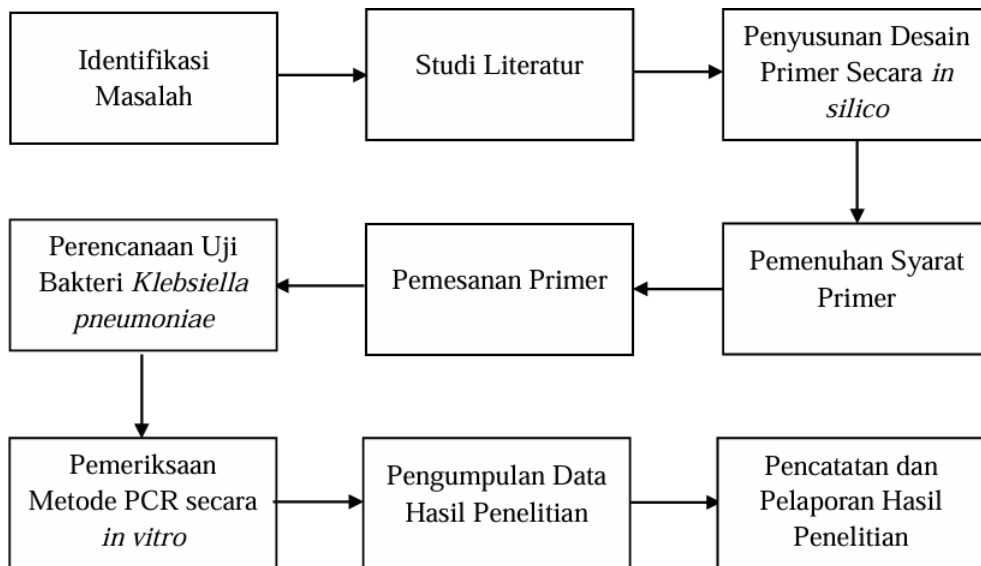


BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian kualitatif deskriptif. Penelitian kualitatif deskriptif adalah jenis penelitian yang bertujuan menggambarkan suatu fenomena melalui situasi dan kondisi ketika penelitian itu dilakukan, kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi, tanpa dimaksudkan untuk menguji suatu hipotesis (Sugiyono, 2023). Pada penelitian ini akan memaparkan hasil desain primer yang telah dibuat melalui website *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), NetPrimer, dan Benchling, yang ditujukan untuk mendeteksi gen blaSHV pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara spesifik.

B. Alur Penelitian



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian PCR dilakukan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar dan Uji Nanodrop di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Warmadewa.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai dari penyusunan proposal bulan November 2025 hingga April 2026.

D. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini yaitu desain primer, optimasi metode PCR, dan hasil uji PCR.

1. Sampel penelitian

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan yaitu DNA bakteri *Klebsiella pneumonia* yang diekstraksi dari koloni bakteri *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, kemudian diremajakan di Laboratorium Terpadu Biologi dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Kriteria sampel penelitian

Sampel yang disimpan dalam cawan petri, berisi hasil peremajaan bakteri *Klebsiella pneumonia* dengan kondisi baik, tidak terkontaminasi atau rusak, dan disimpan sesuai prosedur yang benar.

E. Prosedur Kerja

1. Alat

- a. Alat desain primer

Laptop

- b. Alat pembuatan media Nutrient Agar

Erlenmeyer 100 ml, *hot-plate magnetic stirrer*, *autoclave*, cawan petri, neraca analitik,

- c. Alat peremajaan bakteri

Bio Safety Cabinet, ose, inkubator.

- d. Alat ekstraksi DNA

Mikropipet, *Bio safety cabinet*, rak mikrotube, *refrigerated microcentrifuge*, *vortex mixer*, *refrigerator*, inkubator, *water bath*.

- e. Alat analisis hasil ekstraksi hasil PCR

Neraca analitik, gelas ukur, *beaker glass*, mikropipet, cetakan gel agarose *Hot-plate magnetic stirrer*, elektroforator, *UV-Transluminator*.

- f. Alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR *thermal cycler*, *laminar air flow*, PCR tube, mikropipet, *refrigerated microcentrifuge*, *spindown*.

- g. Alat uji nanodrop

Nanodrop spektrofotometer.

2. Bahan

- a. Bahan pembuatan media *Nutrient Agar*

Media bubuk *Nutrient Agar*, aquadest, *aluminium foil*.

b. Bahan peremajaan bakteri

Bakteri *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, media *nutrient agar* dalam tabung *centrifuge*.

c. Bahan ekstraksi DNA

Hasil peremajaan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, lisozim, proteinase-K, reagen *lysis buffer*, NaCl, reagen PCIA (*Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol*), ethanol 96%, ethanol 70%, reagen TE (tris-EDTA), Microtube, Microtip.

d. Bahan analisis hasil ekstraksi dan hasil PCR

Hasil ekstraksi DNA bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (DNA *template*), bubuk agarose, *Staining gel*, *loading dye*, DNA ladder 100 bp, TAE *buffer*, Nuclease Free Water (NFW), Microtip.

e. Bahan reaksi PCR

Microtube, microtip, *master Mix PCR*, Primer gen *blaSHV* (*Integrated DNA Technologies*), *Nuclease Free Water* (NFW), Hasil ekstraksi DNA bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (DNA *template*).

3. Pre-analitik

Tahap pre analitik meliputi:

- a. Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) lengkap
- b. Disinfeksi daerah kerja
- c. Persiapan alat kerja sesuai keperluan
- d. Persiapan reagen (reagen disuhu ruangan dan di-aliquot sesuai keperluan)

4. Analitik

a. Desain primer dengan analisis *in silico*

- 1) Proses penentuan dan validasi primer dimulai dengan mengakses situs NCBI melalui halaman (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 2) Setelah halaman utama terbuka, pengguna memilih menu *nucleotide*, kemudian memasukkan gen target yang ingin dicari.
- 3) Ketika hasil pencarian muncul, beberapa pilihan gen akan ditampilkan. Pada tahap ini, pengguna perlu memilih gen berupa sekuens DNA dengan melihat keterangan yang tertera di bawah nama gen.
- 4) Apabila pada proses desain primer hingga pengujian menggunakan BLAST ternyata primer tidak bersifat spesifik dengan memperhatikan syarat primer seperti panjang basa, T_m , %GC, Ukuran produk pemilihan gen dapat diulang dengan memilih gen lain sampai diperoleh kandidat yang sesuai.
- 5) Setelah gen DNA yang tepat dipilih, halaman informasi detail gen akan muncul. Pada bagian tersebut, pengguna menekan tombol FASTA untuk menampilkan sekuens gen, kemudian menyalinnya ke notepad dan menyimpan file tersebut dalam format FASTA. File ini selanjutnya digunakan sebagai template untuk desain primer.
- 6) Tahap selanjutnya dilakukan dengan membuka menu PrimerBLAST di situs NCBI.
- 7) File FASTA yang telah disimpan di-upload pada bagian PCR Template, lalu pengguna menekan tombol Get Primers. Dari proses ini, diperoleh sepuluh pasang kandidat primer yang kemudian akan diseleksi lebih lanjut menggunakan situs NetPrimer.

- 8) Setelah mengakses NetPrimer (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) dan melakukan proses log in, pengguna meng klik Launch NetPrimer untuk memulai analisis.
- 9) Pada bagian Oligo Analysis, pengguna memasukkan nama primer dan deskripsinya.
- 10) Primer forward kandidat pertama dituliskan pada kolom *sequence #1*, dan primer reverse kandidat pertama pada kolom *sequence #2*.
- 11) Setelah tombol Analyze ditekan, hasil analisis akan muncul dan dapat diamati. Prosedur ini diulangi untuk sepuluh pasangan primer hingga diperoleh satu pasangan terbaik berdasarkan kriteria desain primer yang baik. Dari hasil evaluasi, misalnya pasangan primer nomor 10 dinilai paling sesuai sehingga dipilih untuk dianalisis lebih lanjut.
- 12) Validasi berikutnya dilakukan melalui platform Benchling (<https://www.benchling.com/>).
- 13) Setelah log in atau membuat akun, pengguna membuat project baru melalui menu Projects, kemudian memilih DNA/RNA *sequence* dan mengunggah file FASTA yang sebelumnya disimpan.
- 14) Sekuens DNA akan muncul secara otomatis pada layar. Untuk memastikan lokasi pengikatan primer, pengguna menekan Ctrl + A dan Ctrl + F, lalu menempelkan urutan primer forward sehingga bagian sekuens yang cocok akan muncul.
- 15) Primer tersebut kemudian disimpan dengan memilih opsi *Create Primer* dan menetapkannya sebagai primer *forward*. Langkah yang sama dilakukan untuk primer *reverse*.

- 16) Setelah kedua primer tersimpan, pengguna menyorot (*highlight*) untaian basa primer *forward*, kemudian sambil menekan tombol Shift, memilih untaian basa primer *reverse*.
- 17) Pada panel kanan, ikon Primers dipilih, kedua primer dicentang, lalu pengguna menekan Link Primers dan memilih *Check Secondary Structures*.
- 18) Sistem akan menampilkan hasil analisis struktur sekunder dari pasangan primer tersebut, yang kemudian dievaluasi kembali berdasarkan kriteria desain primer yang ideal.
- 19) Tahap berikutnya adalah menguji spesifisitas primer menggunakan *Nucleotide BLAST*.
- 20) Pada kolom *Enter Query Sequence*, pengguna memasukkan urutan primer forward. Basis data yang digunakan adalah "*Nucleotide collection (nr/nt)*", sementara pada Program Selection dipilih opsi "*Optimize for somewhat similar sequences (blastn)*". Setelah menandai "*Show result in a new window*", pengguna menekan tombol Blast. Sistem akan menampilkan hasil kecocokan primer pada 100 sekuens dengan tingkat kemiripan tertinggi. Proses yang sama diulangi untuk primer *reverse*.
- 21) Jika hasil BLAST menunjukkan bahwa kedua primer hanya cocok dengan bakteri target dan tidak menunjukkan kecocokan signifikan dengan organisme lain, maka primer dinyatakan spesifik. Setelah tahap validasi selesai dan primer memenuhi seluruh kriteria desain, struktur, serta spesifisitas, primer tersebut dapat dipesan ke vendor penyedia layanan sintesis oligonukleotida.

b. Pembuatan media *Nutrient Agar*

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) dapat dilakukan dengan cara berikut (Astriani & Feladita, 2022)

- 1) Timbang media NA sebanyak 1,6 g lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml
- 2) Larutkan dalam aquadest sebanyak 60 ml
- 3) Kemudian dididihkan diatas *hot plate magnetic stirrer* dan lakukan sterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit dalam suhu 121°C.
- 4) Tunggu dan dinginkan hingga suhu 45 – 50°C, lalu tuangkan ke dalam cawan petri.

c. Peremajaan bakteri *Klebsiella pneumonia*

Pada penelitian ini, peremajaan bakteri *Klebsiella pneumonia* menggunakan media *Nutrient Agar*. Peremajaan dilakukan menggunakan cara inokulasi 1 ose biakan murni bakteri *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 dengan menggunakan teknik penggoresan zig-zag pada permukaan *Nutrient Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nikmah dkk., 2022).

d. Ekstraksi DNA dari bakteri *Klebsiella pneumoniae*

- 1) Siapkan 100 µL NaCl steril, masukan ke dalam *microtube* (A)
- 2) Ambil 3 goresan baketri *Klebsiella pneumoniae* yang sudah diremajakan, masukan ke dalam *microtube* (A), homogenkan
- 3) Pipet 30 µL lisozim dan masukan ke dalam *microtube* (A)
- 4) Inkubasi pada 37°C selama 30 menit, vortex setiap 10 menit selama proses inkubasi.

- 5) Tambahkan 12,5 μ L Proteinase K dan 500 μ L lisis buffer pada *microtube* (A), lalu homogenkan
- 6) Inkubasi pada *waterbath* selama 45 menit dengan suhu 55°C
- 7) Tambahkan 500 μ L *lower phase* PCIA pada *microtube* (A), homogenkan
- 8) Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
- 9) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 10) Setelah sentrifugasi, pindahkan *upper phase* dari *microtube* (A) ke *microtube* (B).
- 11) Tambahkan 500 μ L *chloroform* untuk menghilangkan sisa-sisa PCIA.
- 12) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 13) Setelah sentrifugasi, pindahkan *upper phase* dari *microtube* (B) ke *microtube* (C).
- 14) Tambahkan 500 μ L larutan Ethanol 96% pada *microtube* (C), homogenkan
- 15) Inkubasi *microtube* (C) pada suhu -80°C selama 30 menit
- 16) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 17) Setelah sentrifugasi, buang supernatant
- 18) Tambahkan 300 μ L larutan Ethanol 70% pada *microtube* (C), homogenkan
- 19) Inkubasi *microtube* (C) pada suhu -80°C selama 15 menit
- 20) Lakukan sentrifugasi pada *refrigerated microcentrifuge* dengan kecepatan 15.000 xg selama 5 menit.
- 21) Setelah sentrifugasi, buang *supernatant*

22) Tambahkan 100 μ L larutan TE (*tris*-EDTA) *buffer* pada *microtube* (C), homogenkan.

e. Analisis hasil ekstraksi DNA secara kualitatif

Analisis hasil ekstraksi dilakukan untuk memastikan bahwa proses isolasi DNA berjalan dengan baik. Evaluasi secara kualitatif dilakukan menggunakan gel agarosa, dengan langkah berikut:

- 1) Timbang bubuk agarosa sebanyak 2,25 g, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan larutkan menggunakan 150 ml TAE *buffer* 1x pada *hotplate* hingga larutan berwarna bening.
- 2) Tambahkan *stanning gel* sebanyak 6 μ L pada larutan agarosa kemudian homogenkan.
- 3) Tuangkan larutan agarosa ke cetakan gel elektroforesis, kemudian pasang sisir untuk mencetak *well* pada gel agarosa.
- 4) Tunggu hingga larutan memadat membentuk gel, kemudian cabut sisir.
- 5) Gel agarosa yang sudah memadat dipindahkan ke elektroforator dan tuangkan TAE *buffer* 1x hingga gel terendam.
- 6) Pipet 6 μ L DNA *ladder* dan masukkan ke dalam *well* pertama.
- 7) Untuk masing-masing sampel, ambil 5 μ L DNA lalu tambahkan 1 μ L *loading dye*. Homogenkan, kemudian pipet 6 μ L campuran tersebut ke dalam *well* berikutnya.
- 8) Setelah semua sampel dimasukkan, atur alat elektroforesis pada tegangan 77 volt, arus 200 ampere, dan waktu 60 menit.
- 9) Setelah proses pemisahan selesai, visualisasikan pita DNA menggunakan *UV-transluminator*.

Sedangkan untuk analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan perangkat spektrofotometer *Nanodrop*.

f. Optimasi proses PCR

- 1) Proses PCR dimulai dengan membuat PCR *mix* pada PCR *Tube* sebanyak 24 reaksi sebagai berikut.

Tabel 2
Komposisi Reaksi PCR

| Reagen | Konsentrasi | |
|--|-------------|--------|
| | 1X | 24X |
| Ampliqon III Taq 2x <i>Master Mix</i> | 12,5 µL | 300 µL |
| 10 µM primer <i>forward</i> | 0,5 µL | 12 µL |
| 10 µM primer <i>reverse</i> | 0,5 µL | 12 µL |
| <i>Nuclease Free Water</i> | 9,5 µL | 228 µL |
| DNA <i>template</i> | 2 µL | 48 µL |
| <i>Final Volume</i> | 25 µL | 600 µL |

- 2) Homogenkan reagen menggunakan *vortex mixer*, kemudian lakukan spindown selama beberapa detik agar seluruh cairan yang menempel pada tutup dan dinding tabung terkumpul di bagian bawah.
- 3) Selanjutnya, lakukan tahap optimasi PCR pertama menggunakan *thermal cycler* dengan mengatur program PCR sesuai tahapan yang ditambahkan pada alat, sebagaimana ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 3
Optimasi PCR Pertama

| Tahapan | Suhu | Waktu | Cycle |
|------------------------|-----------------|----------|-------|
| Pre denaturasi | 95°C | 5 menit | 1x |
| Denaturasi | 95°C | 30 detik | |
| <i>Annealing</i> | 47,5 °C-55,6 °C | 30 detik | 30x |
| <i>Extension</i> | 72 °C | 30 detik | |
| <i>Final Extension</i> | 72°C | 5 menit | 1x |

- 4) Tempatkan 12 sampel awal yang akan dijalankan ke dalam *thermal cycler*.
- 5) Tutup penutup *thermal cycler* dengan rapat.
- 6) Tekan tombol *start* untuk memulai proses PCR.
- 7) Biarkan alat bekerja hingga program PCR selesai.
- 8) Setelah proses selesai, simpan produk 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 | |
| <i>Annealing</i> | 55,6 °C-63,6 °C | 30 detik | 30x |
| <i>Extension</i> | 72 °C | 30 detik | |
| <i>Final Extension</i> | 72°C | 5 menit | 1x |

- 10) Letakkan 12 sampel kedua yang akan di running pada alat *thermal cycler*.
- 11) Tutup alat *thermal cycler* dengan rapat.

- 12) Klik start untuk memulai proses PCR.
- 13) Tunggu hingga selesai *running*.
- 14) Analisis 24 sampel hasil PCR dengan elektroforesis.
- 15) Analisis hasil PCR secara kualitatif

Evaluasi hasil PCR dilakukan secara kualitatif menggunakan metode elektroforesis. Produk amplifikasi dipisahkan pada gel agarosa 1,5% dengan menggunakan alat elektroforesis. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan konstan 77 Volt selama 60 menit. Setelah itu, alat dimatikan dan gel diambil untuk diamati menggunakan *UV-transluminator*. Sampel dinyatakan positif apabila muncul pita DNA. Hasil analisis kemudian disajikan dalam bentuk deskriptif.

- 16) Lakukan tahapan PCR menggunakan sampel DNA *E.coli*
- 17) Kemudian lakukan proses elektroforesis dan amati menggunakan *UV transluminator*

5. Pasca analitik

- a. Melakukan observasi, mencatat data, dan mendokumentasikan setiap hasil yang diperoleh.
- b. Melakukan proses pembersihan terhadap peralatan yang telah digunakan.

1) Pembersihan alat gelas

Termasuk *beaker glass* dan erlenmeyer. Buang sisa larutan yang masih tertinggal, kemudian bilas dengan air mengalir. Rendam alat dalam larutan deterjen khusus laboratorium selama 15–30 menit untuk menghilangkan residu. Gosok bagian dalam menggunakan sikat botol steril. Setelah itu, bilas kembali dengan air hingga tidak ada sisa sabun. Keringkan di rak pengering dan simpan di dalam lemari penyimpanan.

2) Pembersihan mikropipet

Mikropipet tidak boleh direndam dalam air karena dapat merusak bagian mekanis di dalamnya. Bersihkan bagian luarnya dengan ethanol 70% atau larutan disinfektan. Jika mikropipet terkena kontaminasi sampel biologis, cuci bagian ujungnya menggunakan air bebas nuklease. Untuk membersihkan piston bagian dalam, gunakan udara bertekanan atau isopropanol. Simpan mikropipet dalam posisi tegak pada rak khusus mikropipet.

3) Pembersihan elektroforator

Termasuk bak elektroforesis, gel tray, dan comb. Bilas menggunakan air suling untuk menghilangkan sisa *buffer* TAE. Rendam komponen tersebut dalam larutan deterjen ringan selama sekitar 15 menit. Jika masih terdapat sisa agarosa, gosok perlahan bagian dalamnya. Setelah itu, bilas dengan NFW untuk memastikan tidak ada kontaminasi DNA yang tersisa. Keringkan seluruh bagian sebelum disimpan.

c. Menyimpan sisa bahan yang digunakan

1) Penyimpanan sisa reagen kimia

Termasuk reagen PCIA, *buffer* TE, reagen elektroforesis, serta reagen PCR. Wadah yang berisi reagen PCIA perlu diberikan lapisan aluminium foil untuk melindunginya dari cahaya. Semua jenis reagen disimpan pada suhu 4°C untuk pemakaian dalam waktu dekat, atau pada suhu -20°C apabila diperlukan untuk penyimpanan jangka panjang.

2) Penyimpanan sisa kultur bakteri *Klebsiella pneumonia*

Untuk penyimpanan jangka panjang, kultur disimpan dalam larutan gliserol 15 – 20% pada suhu -80°C. Jika hanya akan digunakan dalam waktu dekat, kultur dapat disimpan pada suhu 4°C selama 1 – 2 minggu.

d. Pembuangan limbah

1) Limbah infeksius

Termasuk supernatan atau cairan sisa ekstraksi, mikrotip, serta ose sekali pakai yang kontak dengan sampel. Tempatkan seluruh limbah cair dan padat tersebut dalam plastik khusus *autoclave*. Sterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan bakteri mati. Setelah proses sterilisasi selesai, limbah dapat dibuang ke tempat sampah biohazard.

2) Limbah biologi

Mencakup sisa reaksi PCR, gel agarosa, dan sampel DNA yang tidak lagi diperlukan. Gel agarosa yang telah digunakan ditempatkan pada wadah khusus untuk limbah gel. Sementara itu, sampel DNA dalam microtube serta residu PCR dalam tabung eppendorf dimasukkan ke dalam plastik autoclave untuk proses sterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan seluruh organisme mikroba mati. Setelah proses tersebut, limbah dapat dibuang pada tempat sampah biohazard.

3) Limbah umum

Termasuk sarung tangan, penutup kepala, masker, dan tisu. Jika barang-barang ini terpapar bahan infeksius, masukkan ke dalam plastik *autoclave* dan lakukan sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum dibuang. Jika tidak terkontaminasi, limbah dapat langsung dibuang sebagai sampah domestik biasa.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Jenis data primer diperoleh secara langsung dari hasil pemeriksaan dan pengujian di laboratorium yang berkaitan dengan desain primer dan optimasi metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk deteksi gen blaSHV pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Data primer yang dikumpulkan meliputi data primer yang didapatkan secara *in silico* sepasang primer yang spesifik, hasil ekstraksi DNA bakteri *Klebsiella pneumoniae*, hasil optimasi kondisi reaksi PCR terutama pada variasi suhu *annealing*, serta hasil amplifikasi gen blaSHV yang diamati melalui elektroforesis gel agarosa. Keberadaan gen blaSHV ditentukan berdasarkan munculnya pita DNA pada ukuran target ± 184 bp.

b. Data sekunder

Data sekunder adalah data yang tidak dikumpulkan secara langsung oleh peneliti selama proses penelitian, melainkan berasal dari informasi yang sudah tersedia (Sari & Zefri, 2019). Dalam penelitian ini, data sekunder yang digunakan berupa sekuens gen blaSHV bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang diambil dari database *Gene Bank* pada situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Observasi, yakni mengamati pendaran pita DNA hasil PCR dengan menggunakan UV-Transluminator.

- b. Studi literatur, yang dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai sekuens bakteri serta proses perancangan primer.
- c. Pemeriksaan laboratorium, yaitu rangkaian kegiatan PCR beserta proses optimasinya untuk mendapatkan metode paling efektif dalam penggunaan desain primer guna mendeteksi gen blaSHV pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Kertas pengamatan, digunakan sebagai lembar kerja untuk mencatat seluruh hasil, temuan, dan perubahan yang terjadi selama proses penelitian, termasuk saat melakukan observasi langsung di laboratorium. Instrumen ini membantu menjaga keakuratan dan keteraturan pencatatan data.
- b. Komputer atau laptop, berfungsi sebagai perangkat utama dalam melakukan analisis secara *in silico*, seperti pengunduhan sekuens gen, perancangan primer, serta analisis bioinformatika lainnya. Perangkat ini juga digunakan untuk menyimpan, mengolah, dan menginterpretasikan data digital secara sistematis.
- c. Handphone, digunakan untuk mendokumentasikan berbagai proses penelitian melalui foto atau video. Dokumentasi ini penting sebagai bukti visual tahapan eksperimen serta mendukung pelaporan hasil penelitian.
- d. Peralatan laboratorium, yang terdiri dari:
 - 1) PCR *Thermal Cycler*, untuk melakukan amplifikasi DNA sehingga target gen dapat dideteksi dengan jelas.
 - 2) Elektroforator, digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya melalui proses elektroforesis gel.

- 3) *Nanodrop Spektrofotometer*, berfungsi mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA, yang merupakan langkah penting sebelum PCR dilakukan.
- 4) *UV-Transluminator*, digunakan untuk memvisualisasikan pita DNA setelah proses elektroforesis, sehingga peneliti dapat memastikan keberhasilan amplifikasi gen target.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Langkah-langkah pengolahan data yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Pemeriksaan data (*Editing*), yaitu tahap awal untuk meninjau kembali seluruh data yang telah terkumpul, memastikan kelengkapan, ketepatan, dan konsistensinya. Pada tahap ini, peneliti mengevaluasi apakah data yang diperoleh relevan dengan fokus penelitian serta memperbaiki jika terdapat kesalahan pencatatan atau informasi yang kurang.
- b. Pemberian kode (*Coding*), yakni proses mengklasifikasikan atau memberi label tertentu pada setiap data sesuai kategori yang dibutuhkan. Tujuannya adalah memudahkan proses identifikasi dan analisis data. Pada penelitian ini, kegiatan coding dilakukan saat optimasi suhu annealing, di mana setiap variasi suhu yang diuji diberikan tanda atau kode khusus untuk membedakan hasil amplifikasinya.
- c. Pemasukan data (*Entry*), yaitu tahap memasukkan data yang telah diperiksa dan dikodekan ke dalam format yang siap dianalisis, baik berupa tabel, catatan digital, ataupun perangkat lunak pendukung. Pada tahap ini, seluruh kertas pengamatan, catatan laboratorium, dan dokumentasi dikumpulkan serta disusun kembali agar siap diolah lebih lanjut.

d. Penyusunan data (*Tabulating*), yaitu menyajikan data dalam bentuk tabel, grafik, gambar, atau daftar sehingga memudahkan proses pengamatan, perbandingan, dan evaluasi. Dalam penelitian ini, hasil yang ditabulasikan berupa visualisasi amplifikasi DNA gen blaSHV dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan primer hasil desain *in silico*, beserta penentuan suhu annealing optimal berdasarkan metode PCR yang diterapkan.

2. Analisis data

Pada penelitian ini, data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Data berupa karakteristik primer dianalisis menggunakan metode *in silico* pada website NCBI, NetPrimer, dan Benchling. Sementara itu, data hasil ekstraksi DNA dan hasil PCR diolah secara manual, kemudian dijelaskan secara deskriptif dalam bentuk narasi yang didukung oleh kajian pustaka yang relevan.