

Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* untuk Deteksi Gen *mecA* pada Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dari Rumah Sakit

Sabda Astra Fanila¹, Kurnia Ritma Dhanti², Kurniawan³, Arif Mulyanto⁴

¹ Program Studi, D IV Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jawa Tengah-Indonesia

Abstrak

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan bakteri *S.aureus* yang resisten terhadap antibiotik β -laktam dan berperan penting dalam infeksi nosokomial di rumah sakit. Gen *mecA* berfungsi sebagai penanda molekuler untuk strain MRSA yang dapat dideteksi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), di mana efisiensi amplifikasi dipengaruhi oleh konsentrasi primer dan suhu *annealing*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang optimal dalam mendeteksi gen *mecA* pada bakteri MRSA udara di ruangan rumah sakit. Metode pada penelitian ini menggunakan desain eksperimental. Suhu *annealing* divariasikan menjadi 53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C, serta konsentrasi primer divariasikan menjadi 5 μ M dan 10 μ M. Analisis pita DNA dilakukan secara visual menggunakan *UV transluminator* dan luas area pita DNA menggunakan aplikasi *imageJ*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* 53°C menghasilkan amplifikasi gen *mecA* yang lebih optimal dibandingkan suhu *annealing* 55°C, 57°C, dan 59°C. Selain itu, penggunaan konsentrasi primer 10 μ M memberikan hasil amplifikasi yang lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi primer 5 μ M. Kesimpulan dari penelitian ini adalah suhu *annealing* 53°C dan konsentrasi primer 10 μ M merupakan kombinasi yang optimal dalam mendeteksi gen *mecA* pada bakteri MRSA, baik secara visual maupun kuantitatif.

Kata Kunci : Gen *mecA*, Konsentrasi Primer, MRSA, PCR, Suhu *Annealing*

Optimization of Primer Concentration and *Annealing* Temperature for Detection of the *mecA* Gen in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Bacteria from Hospitals

Abstract

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is a β -lactam antibiotic-resistant *S. aureus* that plays an important role in nosocomial infections in hospitals. The *mecA* gene serves as a molecular marker for MRSA strains that can be detected using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method, where amplification efficiency is affected by primer concentration and *annealing* temperature. This study aims to obtain the optimal primer concentration and *annealing* temperature in detecting the *mecA* gene in airborne MRSA bacteria in hospital rooms. The method in this study uses an experimental design. The *annealing* temperature was varied to 53°C, 55°C, 57°C, and 59°C, and the primer concentration was varied to 5 μ M and 10 μ M. DNA band analysis was performed visually using a UV transluminator and the area of the DNA band using *imageJ* application. The results of this study indicate that *annealing* temperature of 53°C produces more optimal *mecA* gene amplification compared to *annealing* temperatures of 55°C, 57°C, and 59°C. In addition, the use of a primer concentration of 10 μ M provides better amplification results compared to a primer concentration of 5 μ M. The conclusion of this study is an *annealing* temperature of 53°C and a primer concentration of 10 μ M are the optimal combination in detecting the *mecA* gene in MRSA bacteria, both visually and quantitatively.

Keywords: : *Annealing* Temperature, *mecA* gene, MRSA, PCR, Primer Concentration

Korespondensi: Kurnia Ritma Dhanti S.Si.,M.Biotech, Prodi D IV Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jalan KH. Ahmad Dahlan Kembaran Banyumas, *mobile* 083838494944, *e-mail* kurniaritmadhanti@ump.ac.id

Pendahuluan

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus, nonmotil, dan secara morfologi sel-selnya berkelompok menyerupai gugusan anggur (Erlin *et al.*, 2020). *S. aureus* menjadi salah satu mikrobiota kulit, tetapi pada inang yang rentan dapat menyebabkan infeksi (Nuryah *et al.*, 2019). *S. aureus* didapatkan di udara dan lingkungan sekitar, sehingga menjadi spesies yang sering menyebabkan infeksi (Trisia *et al.*, 2018).

S. aureus dapat mengalami resistensi dikarenakan penggunaan antibiotik secara berulang-ulang (Wijayanti & Safitri, 2018). Strain *S. aureus* yang resisten pada antibiotik metisilin dan β -laktam adalah *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Rahman *et al.*, 2023). Penyebab resistensi yaitu gen *mecA* pada *S. aureus* mengkode pembentukan *Penicillin Binding Protein* (PBP2a atau PBP2'), sehingga menurunkan afinitas *S. aureus* terhadap metisilin. Gen *mecA* berfungsi sebagai penanda molekuler yang sangat bermanfaat untuk strain MRSA (Prajawaty & Fatmawati, 2018).

S. aureus yang mengalami resistensi terhadap metisilin (MRSA) muncul di beberapa rumah sakit setelah metisilin pertama kali dikenalkan pada tahun 1960. MRSA telah menjadi penyebab utama infeksi nosokomial (Asri *et al.*, 2017). Terdapat dua jenis MRSA yaitu *community-acquired* MRSA (CA-MRSA) dan *hospital-acquired* MRSA (HA-MRSA) (Galia *et al.*, 2019). CA-MRSA adalah strain yang lebih baru dan virulen, yang muncul pada akhir tahun 1990-an serta menjadi penyebab utama infeksi kulit dan jaringan lunak pada orang yang sehat dan berusia muda. HA-MRSA berkaitan dengan infeksi nosokomial seperti endokarditis dan sering resisten terhadap agen antimikroba non- β -laktam terutama aminoglikosida, makrolida, linkosamida dan fluorokuinolon (Kateete *et al.*, 2019). Bakteri MRSA di rumah sakit menyebar antar pasien melewati peralatan medis yang tidak steril, udara serta prasarana di ruangan, seperti selimut atau kain tempat tidur (Dwiyanti *et al.*, 2015).

Menurut Fitrandi *et al* (2023) prevalensi infeksi MRSA di Asia sebesar 70%, sedangkan di Indonesia khususnya untuk wilayah Jawa dan Bali sebesar 3,1%. Berdasarkan hasil pengawasan nasional yang dilakukan di delapan rumah sakit rujukan utama, permasalahan MRSA sangat tinggi. Prevalensi infeksi MRSA berkisar antara 25%-65% dengan rerata nasional sebesar 38% (Syaniar *et al.*, 2024). Hal tersebut

menunjukkan bahwa rumah sakit telah menjadi daerah endemis untuk penularan MRSA. Petugas kesehatan di wilayah Banyumas yang terinfeksi MRSA sebesar 14% untuk rumah sakit swasta dan 25% untuk rumah sakit pemerintah (Susanti *et al.*, 2020).

Semakin meningkatnya infeksi MRSA, maka sangat diperlukan alternatif diagnostik dini yang spesifik terhadap MRSA. Salah satu metode yang cepat dan tepat untuk diagnosis ini yaitu dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR memungkinkan untuk mendeteksi suatu gen dengan melipatgandakan jumlah DNA gen tersebut (Amanda *et al.*, 2019). PCR terdiri dari beberapa langkah, seperti denaturasi, *annealing*, dan ekstensi berulang (Yuenleni, 2019).

Menurut Jannah (2023) kualitas komponen yang digunakan serta suhu dan durasi waktu yang diukur pada setiap tahapan siklus PCR dapat memengaruhi hasil deteksi, dikarenakan PCR merupakan metode diagnostik yang sensitif. Suhu *annealing* dan konsentrasi primer merupakan dua faktor yang perlu dioptimalkan dalam proses PCR untuk meningkatkan sensitivitas, spesifitas, dan presisi pengujian (Siswanto *et al.*, 2020). Primer dapat menempel pada cetakan DNA non spesifik ketika suhu *annealing* yang digunakan terlalu rendah. Sebaliknya, primer yang sudah menempel pada cetakan DNA dapat terlepas ketika suhu *annealing* yang digunakan terlalu tinggi, sehingga produk PCR tidak terbentuk (Aulia *et al.*, 2021).

Hasil penelitian Faisal *et al* (2019) menunjukkan bahwa suhu *annealing* 55°C menghasilkan gen *mecA* yang teramplifikasi dengan baik, dibandingkan dengan suhu *annealing* 60°C. Hal tersebut menunjukkan suhu *annealing* yang terlalu tinggi membuat gen *mecA* tidak teramplifikasi dengan baik, sehingga optimasi suhu *annealing* perlu dilakukan.

Konsentrasi primer jika terlalu tinggi atau rendah, mengakibatkan kurangnya amplifikasi dan pembentukan primer dimer (suatu kondisi *band* lain yang tidak spesifik mengikuti *band* yang terbentuk) (Setyawati & Zubaidah, 2021). Hasil penelitian Mardiana *et al* (2023) juga menyebutkan bahwa konsentrasi primer yang tepat dapat memberikan kualitas *band* yang lebih jelas, bersih, dan tebal.

Suhu *annealing* maupun konsentrasi primer untuk deteksi gen *mecA* dalam bakteri MRSA perlu dilakukan optimasi untuk menghasilkan hasil yang baik. Optimasi tersebut dilakukan supaya gen *mecA* dapat teramplifikasi dengan baik dan mendapatkan suatu *band* yang

optimal. Bakteri MRSA yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari udara ruangan perawatan dan rawat inap yang berada di salah satu rumah sakit wilayah Purbalingga dan Cilacap, Jawa Tengah. Penggunaan bakteri MRSA tersebut didasarkan pada semakin meningkatnya infeksi yang disebabkan oleh bakteri MRSA di rumah sakit, serta penularannya yang tidak hanya melalui kontak fisik antar pasien tetapi juga melalui udara.

Metode

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan desain eksperimental. Pengumpulan data dilakukan dengan cara melakukan variasi pada konsentrasi primer dan suhu *annealing* untuk mendapatkan konsentrasi yang optimal. Konsentrasi primer divariasikan menjadi 5 μ M dan 10 μ M, serta untuk suhu *annealing* divariasikan menjadi 53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C. Produk PCR gen *mecA* yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis pada pita DNA yang terdeteksi, untuk melihat konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang mengamplifikasi gen *mecA* dengan baik. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Botani Universitas Muhammadiyah Purwokerto pada bulan Mei sampai Juni 2023.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi primer (5 μ M dan 10 μ M) dan suhu *annealing* (53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C), sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kualitas gen *mecA* yang terdeteksi. Kualitas gen *mecA* yang teramplifikasi secara kualitatif dilihat dari pita DNA yang jelas, tebal, dan terang serta sesuai dengan target pada DNA *Ladder*. Secara kuantitatif kualitas gen *mecA* dilihat dari luas area pita DNA yang didapatkan dari analisis menggunakan aplikasi *imageJ*.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri MRSA yang berasal dari udara ruangan perawatan dan rawat inap yang berada di salah satu rumah sakit wilayah Purbalingga dan Cilacap, Jawa Tengah. Isolat tersebut merupakan koleksi arsip yang sebelumnya dikarakterisasi oleh tim peneliti di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Purwokerto pada tahun 2022. Penelitian ini menggunakan 2 isolat dengan kode R.AT2.U4 dan R.PG.U4.

Alat yang digunakan yaitu mikropipet, sentrifus, *UV Transluminator*, *Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf)*, dan kit elektroforesis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu DNA *Ladder* 100 bp

(*Geneaid*), *loading dye (Geneaid)*, ddH₂O (*aquabides*), *Ethidium bromide*, *MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd)*, TAE *buffer* 1X, media *Lactose Broth (LB)*, agarosa, NaCl fisiologis, lisozim, primer *forward* 5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3', primer *reverse* 5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3', *tube PCR*, *white tip*, *yellow tip*, *highpure filter tube*, *collection tube*, dan tabung *ependorf*.

Ekstraksi DNA MRSA dilakukan dengan memindahkan kultur bakteri MRSA sebanyak 1,5 mL yang telah ditumbuhkan pada media *Lactose Broth (LB)* ke dalam tabung *ependorf*. Tabung *ependorf* yang berisikan kultur bakteri disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang sehingga hanya tersisa *pellet*. *Pellet* ditambahkan 200 μ L NaCl fisiologis dan 5 μ L lisozim, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Campuran larutan tersebut yang selanjutnya digunakan dalam proses ekstraksi.

Proses ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan pedoman dari *High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)*. Ekstraksi DNA dalam kit tersebut terdiri dari beberapa tahapan yaitu pelisisan sel, pengikatan (*binding*), pencucian (*washing*), dan elusi (*elution*). Ekstraksi diawali dengan penambahan 40 μ L *lysis buffer* dan 200 μ L *binding buffer*, lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C. Larutan dipindahkan ke dalam *highpure filter tube* yang sudah dimasukkan ke dalam *collection tube*, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. *Collection tube* diganti, lalu *pellet* ditambahkan 500 μ L *inhibitor remove buffer*, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. *Collection tube* diganti, lalu *pellet* ditambahkan 500 μ L *wash buffer*, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. *Collection tube* diganti dengan tabung *ependorf*, lalu *pellet* ditambahkan 200 μ L *wash buffer*, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Larutan yang berada di dalam tabung *ependorf* merupakan sampel yang dijadikan sebagai *template DNA* dalam proses PCR. Sampel DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C.

Proses amplifikasi gen *mecA* dilakukan dengan *MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd)*, dan menggunakan alat *Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf)*. Komponen di dalam satu reaksi PCR terdiri dari campuran 1,25 μ L *MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd)*,

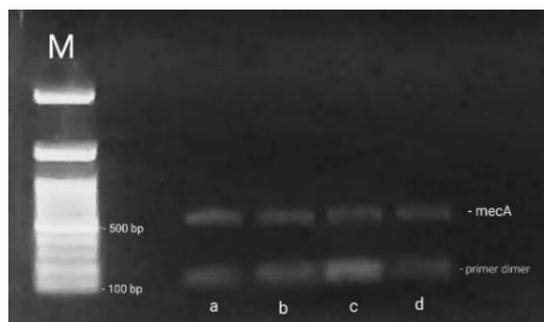
6,5 μL ddH₂O, 2 μL *forward primer* 5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3' konsentrasi 5 μM dan 10 μM , 2 μL *reverse primer* 5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3' (Kemalapatni *et al.*, 2017) konsentrasi 5 μM dan 10 μM , dan 2 μL sampel *template DNA*. PCR dijalankan dengan pengaturan pre denaturasi 5 menit pada suhu 94°C, denaturasi 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* (penempelan primer) 30 detik dengan suhu divariasikan menjadi 53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C, *extension* (pemanjangan) 1 menit pada suhu 72°C, serta *final extension* 10 menit pada suhu 72°C dengan jumlah siklus sebanyak 30 siklus.

Gen *mecA* yang teramplifikasi dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1% yang telah dilarutkan dengan TAE buffer 1X, dan ditambahkan 1 μL *ethidium bromide*. Setiap *well* gel agarosa dimasukan campuran 5 μL sampel hasil amplifikasi dan 1 μL *loading dye* (Geneaid). Diletakkan DNA Ladder 100 bp (Geneaid) pada *well* pertama sebagai pembanding. Proses elektroforesis dilakukan dengan aliran arus listrik 100 volt dalam waktu 30 menit menggunakan TAE buffer 1X. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan UV Transluminator dan dianalisis menggunakan aplikasi *imageJ*. Sampel yang teridentifikasi gen *mecA* pada saat diamati terbentuk *band* (pita) diantara 500 bp dan 600 bp (Kemalapatni *et al.*, 2017)

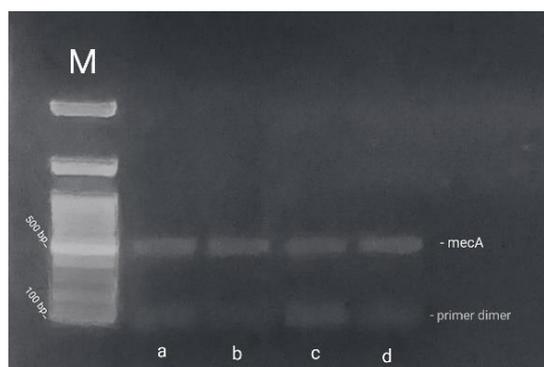
Data dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, *band* yang terbentuk divisualisasikan menggunakan UV Transluminator. Secara kuantitatif, luas area pita DNA dianalisis menggunakan aplikasi *imageJ*. Analisis pita DNA pada aplikasi *imageJ* dilakukan dengan cara mengunggah gambar hasil visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada aplikasi. Gambar akan diubah menjadi mode 8-bit, lalu pita DNA yang gelap akan direkam dengan nilai kepadatan yang lebih tinggi. Selanjutnya, aplikasi akan menganalisis DNA melalui pengukuran area pita DNA gen *mecA*. Hasil akhir diperoleh luas area pita DNA gen *mecA* dari foto hasil visualisasi elektroforesis yang telah diunggah (Lukemiller, 2010).

Hasil

1. Hasil visualisasi gen *mecA* menggunakan UV Transluminator
 - a. Hasil visualisasi sampel R.AT2.U4

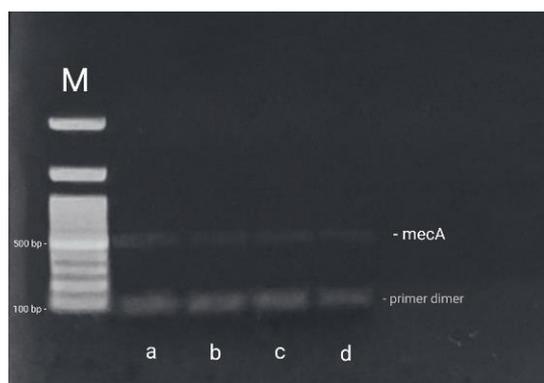


Gambar 1. Visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada sampel dengan kode R.AT2.U4 menggunakan primer konsentrasi 5 μM diikuti variasi suhu *annealing* 53°C (a), 55°C (b), 57°C (c), 59°C (d) dan M (Marker).

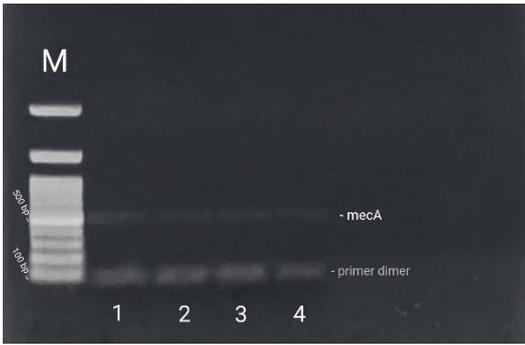


Gambar 2. Visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada sampel dengan kode R.AT2.U4 menggunakan primer konsentrasi 10 μM diikuti variasi suhu *annealing* 53°C (a), 55°C (b), 57°C (c), 59°C (d) dan M (Marker).

b. Hasil visualisasi sampel R.PG.U4

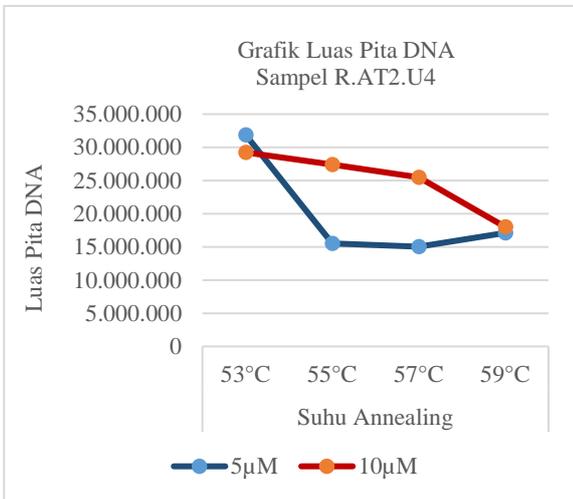


Gambar 3. Visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada sampel dengan kode R.PG.U4 menggunakan primer konsentrasi 5 μM diikuti variasi suhu *annealing* 53°C (a), 55°C (b), 57°C (c), 59°C (d) dan M (Marker).

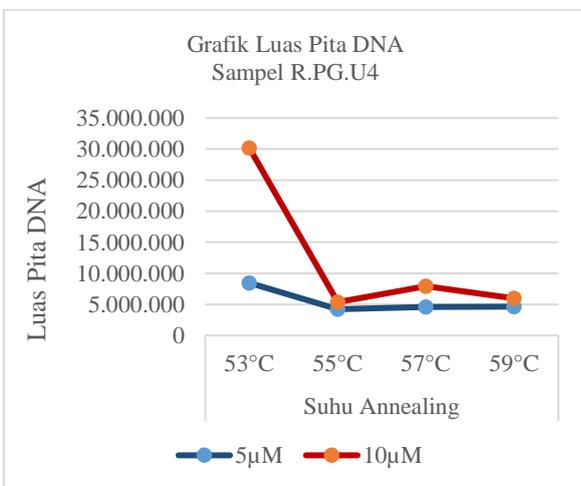


Gambar 4. Visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada sampel dengan kode R.PG.U4 menggunakan primer konsentrasi 10 μ M diikuti variasi suhu *annealing* 53°C (a), 55°C (b), 57°C (c), 59°C (d) dan M (Marker)

2. Hasil analisis luas area pita DNA menggunakan aplikasi *imageJ*



Gambar 5. Perbandingan luas pita DNA gen *mecA* sampel kode R.A.T2.U4 pada primer konsentrasi 5 uM dan 10 uM di setiap variasi suhu *annealing* (53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C).



Gambar 6. Perbandingan luas pita DNA gen *mecA* sampel kode R.PG.U4 pada primer konsentrasi 5uM dan 10 uM di setiap variasi suhu *annealing* (53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C).

Pembahasan

Hasil produk PCR yang telah melewati proses elektroforesis kemudian divisualisasikan menggunakan *UV Transluminator* menunjukkan adanya gen *mecA*, ditandai dengan terbentuknya pita DNA diantara 500 bp dan 600 bp. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Sugireng & Rosdarni (2020) yang menyatakan bahwa gen *mecA* memiliki pita DNA dengan berat molekul sekitar 533 bp.

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan hasil visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada isolat bakteri MRSA dengan kode R.AT2.U4. Hasil visualisasi pita DNA sampel dengan kode R.AT2.U4 terlihat lebih jelas, tebal, dan terang, serta sesuai dengan target pada DNA *Ladder* (M) ketika menggunakan konsentrasi primer 10 μ M (Gambar 1), dibandingkan ketika menggunakan konsentrasi primer 5 μ M (Gambar 2). Suhu *annealing* 53°C (a) di setiap konsentrasi primer yang digunakan pada sampel R.AT2.U4 (Gambar 1 dan Gambar 2), menghasilkan pita DNA yang terlihat lebih jelas, tebal, dan terang, serta sesuai target pada DNA *Ladder* (M) dibandingkan dengan suhu *annealing* 55°C (b), 57°C (c), dan 59°C (d).

Gambar 3 dan Gambar 4 menunjukkan hasil visualisasi elektroforesis gen *mecA* pada isolat bakteri MRSA dengan kode R.PG.U4. Hasil visualisasi pita DNA sampel dengan kode R.PG.U4 terlihat lebih jelas, tebal, dan terang, serta sesuai dengan target pada DNA *Ladder* (M) ketika menggunakan konsentrasi 10 μ M (Gambar 3), dibandingkan ketika menggunakan konsentrasi primer 5 μ M (Gambar 4). Suhu *annealing* 53°C (a) di setiap konsentrasi primer yang digunakan pada sampel R.PG.U4 (Gambar 3 dan Gambar 4), menghasilkan pita DNA yang terlihat lebih padat, jelas, dan terang, serta sesuai target pada DNA *Ladder* (M) dibandingkan dengan suhu *annealing* 55°C (b), 57°C (c), dan 59°C (d).

Kualitas *Band* (pita) yang jelas, tebal, dan terang serta sesuai dengan target menunjukkan hasil analisis visualisasi elektroforesis secara kualitatif yang baik (Aulia *et al.*, 2021; Setyawati & Zubaidah, 2021; Sandra *et al.*, 2025). Selain itu, tidak adanya *smear* pada kedua sampel menunjukan kualitas pita DNA yang baik. *Smear* merupakan penanda bahwa masih terdapat adanya bahan pengotor yang terbawa ketika proses isolasi DNA, yang dapat berupa protein, DNA yang terdegradasi, dan zat lainnya (Mawardi *et al.*, 2020).

Hasil produk PCR di setiap sampel masih menunjukkan terbentuknya primer dimer. Produk

non spesifik yang dihasilkan selama proses elongasi atau pemanjangan primer disebut dengan primer dimer. Pembentukan primer dimer mengganggu pembentukan produk PCR spesifik selama PCR, sehingga mengurangi efisiensi amplifikasi. Struktur dimer terbentuk ketika primer mengandung terlalu banyak basa komplementer (Anissa *et al.*, 2023). Berdasarkan penelitian Gonzales *et al* (2015) dalam Hafsa *et al* (2023) primer dimer dalam produk PCR disebabkan oleh jumlah DNA yang dicampurkan tidak mencukupi atau konsentrasi primer yang digunakan terlalu tinggi.

Hasil ekstraksi pada kedua sampel yang digunakan, memiliki perbedaan pada jumlah konsentrasi DNA yang terdapat di setiap sampel. Sampel dengan kode R.AT2.U4 menghasilkan pita DNA yang lebih jelas, tebal dan terang, serta sesuai dengan target (Gambar 1 dan Gambar 2), dibandingkan sampel dengan kode R.PG.U4 (Gambar 3 dan Gambar 4) menghasilkan pita DNA yang lebih tipis. Karena, konsentrasi DNA berbanding lurus dengan ketebalan pita DNA yang terbentuk, jika konsentrasi DNA tinggi maka pita DNA yang terbentuk akan semakin tebal (Herman *et al.*, 2017). Senyawa yang ada di setiap sampel, prosedur ekstraksi dan isolasi DNA, maupun teknik presipitasi DNA yang digunakan dapat memengaruhi jumlah konsentrasi DNA (Buchori *et al.*, 2023).

Perbedaan ketebalan *band* (pita) dianalisis lebih lanjut menggunakan aplikasi *imageJ*. Gambar 5 dan Gambar 6 menunjukkan hasil analisis luas area pita DNA dari sampel dengan kode R.AT2.U4 (Gambar 5) dan R.PG.U4 (Gambar 6). Hasil tersebut menunjukkan terdapat perbedaan luas area pita DNA pada konsentrasi 10 μM (garis merah) dengan konsentrasi primer 5 μM (garis biru) di setiap variasi suhu *annealing* (53°C, 55°C, 57°C, dan 59°C). Primer dengan konsentrasi 10 μM (garis merah) secara keseluruhan menghasilkan luas area pita DNA yang lebih luas pada kedua sampel, dibandingkan dengan luas area pita DNA pada konsentrasi primer 5 μM (garis biru).

Suhu *annealing* 53°C menghasilkan luas area pita DNA yang lebih besar pada sampel dengan kode R.AT2.U4 (Gambar 5) dan R.PG.U4 (Gambar 6), dibandingkan pada suhu *annealing* 55°C, 57°C, dan 59°C. Menurut Putri *et al* (2024) hasil analisis luas area pita DNA dengan aplikasi *imageJ* yang semakin besar diartikan sebagai pita DNA yang dihasilkan semakin baik.

Berdasarkan analisis pita DNA secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan aplikasi *imageJ* diperoleh konsentrasi primer yang

optimal untuk deteksi gen *mecA* pada bakteri MRSA yaitu primer dengan konsentrasi 10 μM . Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Setyawati & Zubaidah (2021) yang menyatakan bahwa primer dengan konsentrasi 10 μM menghasilkan kualitas *band* yang lebih optimal dibandingkan primer dengan konsentrasi 5 μM . Sedangkan, suhu *annealing* yang optimal untuk deteksi gen *mecA* yaitu pada suhu 53°C. Hasil penelitian ini diperkuat oleh Khusnan *et al* (2016) yang menyatakan bahwa suhu *annealing* 53°C menghasilkan gen *mecA* yang teramplifikasi dengan baik pada bakteri MRSA.

Perbedaan konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang digunakan dalam proses amplifikasi memengaruhi variasi ketebalan dari pita DNA gen *mecA* pada bakteri MRSA udara yang teramplifikasi. Semakin tebal pita DNA menunjukkan semakin banyaknya konsentrasi DNA yang ada (Herman *et al.*, 2017). Perbedaan ketebalan pita DNA yang terbentuk menunjukkan bahwa optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer perlu dilakukan. Optimasi suhu *annealing* berhubungan dengan spesifitas dan sensitivitas produk PCR, karena suhu *annealing* merupakan suhu tempat terjadinya penempelan *template* DNA pada primer (Faisal *et al.*, 2019).

Optimasi primer perlu dilakukan karena dapat memengaruhi sensitivitas reaksi PCR sehingga konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau rendah berisiko menimbulkan hasil negatif palsu (Siswanto *et al.*, 2020). Konsentrasi primer yang tinggi dapat menghasilkan pita yang tebal diikuti dengan pita nonspesifik (*unspecific band*) (Yuenleni, 2019).

Proses PCR memiliki berbagai tahapan mulai dari denaturasi, *annealing*, dan *ekstention* berulang (Setyawati & Zubaidah, 2021). Oleh karena itu, banyak tahapan yang perlu dilakukan untuk mencapai hasil produk PCR supaya optimal. Keadaan sampel, reagen, dan peralatan yang dipakai di masing-masing laboratorium juga bisa memengaruhi hasil PCR, bukan hanya suhu *annealing* dan konsentrasi primer (Anissa *et al.*, 2023).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang optimal untuk deteksi gen *mecA* pada bakteri MRSA udara yaitu 10 μM dengan suhu 53°C. Karena, pita DNA gen *mecA* secara visualisasi terlihat lebih jelas, tebal dan terang, serta sesuai dengan target pada DNA *Ladder*. Sedangkan secara kuantitatif luas area pita DNA yang dihasilkan lebih besar.

Diharapkan kepada peneliti selanjutnya untuk menambah jumlah sampel dalam

penelitian sehingga dapat memperoleh perbandingan yang lebih akurat. Sebelum melakukan proses PCR dapat dilakukan pengukuran konsentrasi DNA terlebih dahulu, sehingga konsentrasi DNA yang teramplifikasi mencukupi dan mendapatkan visualisasi DNA yang lebih jelas, tebal dan terang.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Muhammadiyah Purwokerto yang telah mendanai penelitian ini. Tim Peneliti Laboratorium Mikrobiologi (Nurhidayanti & Trimahwati, 2022) Teknologi Laboratorium Medik DIV Universitas Muhammadiyah Purwokerto yang telah menghibahkan isolat bakteri MRSA, dan untuk semua pihak yang telah membantu sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan artikel.

Daftar Pustaka

- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu *Annealing* Proses PCR Amplifikasi Gen *shv* Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6. <https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jmfarmasi/article/view/39969/75676585518>
- Anissa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, A. T. (2023). Optimasi Metode *Nested* PCR untuk Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v13n1.p1-13>
- Asri, R. C., Rasyid, R., & Edison. (2017). Identifikasi MRSA pada Diafragma Stetoskop di Ruang Rawat Inap dan HCU Bagian Penyakit Dalam. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(2), 239–244. <https://doi.org/10.25077/jka.v6i2.685>
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18(1), 44–54. <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v17>
- Buchori, A., Firmansah, H., Anika, M., Ratnawati, S., Ulfa, U. T., & Zendrato, Y. (2023). Komparasi Metode Ekstraksi DNA Menggunakan Daun Padi: Review. *Agriculture and Biological Technology*, 1(1), 40–50. <https://doi.org/10.61761/agiotech.1.1.40-50>
- Dwiyanti, R. D., Muhlisin, A., & Muntaha, A. (2015). MRSA dan VRSA pada Paramedis RSUD Ratu Zalecha Martapura. *Medical Laboratory Technology Journal*, 1(1), 27–33. <https://doi.org/10.31964/mltj.v1i1.5>
- Erlin, E., Rahmat, A., Redjeki, S., & Purwianingsih, W. (2020). Deteksi *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) sebagai Penyebab Infeksi Nosokomial pada Alat-alat di Ruang Perawatan Bedah. *Quagga: Jurnal Pendidikan Dan Biologi*, 12(2), 137–144. <https://doi.org/10.25134/quagga.v12i2.2671>
- Faisal, M., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu *Annealing* Gen *mecA* Resistensi Antibiotik Amoksilin dari Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–12. <https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jmfarmasi/article/view/41857>
- Fitrandi, M., Salasia, S. I. O., Sianipar, O., Dewananda, D. A., Arjana, A. Z., Aziz, F., Wasissa, M., Lestari, F. B., & Santosa, C. M. (2023). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Isolates Derived From Humans and Animals in Yogyakarta, Indonesia. *Veterinary World*, 16(1), 239–245. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.239-245>
- Galia, L., Ligozzi, M., Bertocelli, A., & Mazzariol, A. (2019). Real-time PCR Assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance Directly from Clinical Samples. *AIMS Microbiology*, 5(2), 138–146. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.2.138>

- Hafsah, J., Achyar, A., Atifah, Y., & Advinda, L. (2023). Specific Primary Design and Optimization of *Monodehydroascorbate reductase* (MDHAR) Gene Amplification in Rice (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Serambi Biologi*, 8(3), 346–354. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>,
- Herman, H., Natalya, L. N., Berampu, S. M., & Roslim, D. I. (2017). Optimasi Suhu *Annealing* untuk Primer g-SSR dan EST-SSR pada Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.). *Jurnal Dinamika Pertanian*, 33(1), 95–102. [https://doi.org/10.25299/dp.2017.vol33\(1\).3821](https://doi.org/10.25299/dp.2017.vol33(1).3821)
- Jannah, M. (2023). Optimalisasi Kondisi PCR Untuk Amplifikasi Sekuen Gen HBB. *Oryza: Jurnal Pendidikan Biologi*, 12(1), 36–42. <https://doi.org/10.33627/oz.v12i1.1057>
- Kateete, D. P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., Ashaba, F. K., Baluku, H., Najjuka, C. F., Källander, K., Rutebemberwa, E., Asiimwe, B. B., & Joloba, M. L. (2019). CA-MRSA and HA-MRSA Coexist in Community and Hospital Settings in Uganda. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(94), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0551-1>
- Kemalapatni, D. W., Jannah, S. N., Budiharjo, A., & Soedarto, J. (2017). Deteksi MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) pada Pasien Rumah Sakit dengan Metode Maldi-TOF MS dan Multiplex PCR. *Jurnal Biologi*, 6(4), 51–61. <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/19607>
- Khusnan, Kusmanto, D., & Slipranata, M. (2016). Resistensi Antibiotik dan Deteksi Gen Pengode *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolat Broiler di Wilayah Yogyakarta. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10(1), 13–18. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v10i1.3360>
- Lukemiller. 2010. *Analyzing gels and western blots with ImageJ*. Search. Published online:1-14. <https://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>
- Mardiana, A., Dhanti, K. R., Kurniawan, & Sulistyowati, R. (2023). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* dalam Mendeteksi Gen *BlaZ* pada Bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* di Udara. *Borneo Journal Of Medical Laboratory Technology*, 6(1), 389–391. <https://doi.org/10.33084/bjmlt.v6i1.6076>
- Mawardi, A., Maury, H. K., & Maladan, Y. (2020). Analisis Perbandingan Kualitas Produk Amplikon Gen PMSA2 Antara Spesimen Spot Darah Kering dan Vena. *Jurnal Biologi Papua*, 12(1), 10–18. <https://doi.org/10.31957/jbp.949>
- Nuryah, A., Yuniarti, N., & Puspitasari, I. (2019). Prevalensi dan Evaluasi Kesesuaian Penggunaan Antibiotik pada Pasien dengan Infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* di RSUP Dr. Soeradji Tirtonegoro Klaten. *Majalah Farmasetik*, 15(2), 123–129. <https://doi.org/10.22146/farmasetik.v15i2.47911>
- Prajawaty, P. A. U., & Fatmawati, N. N. D. (2018). Deteksi Molekuler *mecA* pada Isolat Klinis *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di RSUP Sanglah Denpasar. *Intisari Sains Medis*, 9(3), 74–77. <https://doi.org/10.15562/ism.v9i3.327>
- Putri, A. N. A., Indra, A. I. N., Merdekawati, F., & Abror, Y. K. (2024). Optimasi Variasi Voltase dan Waktu terhadap Kulit Pita DNA *Escherichia Coli* pada Proses Elektroforesis Gel Agarosa. *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, 5(2), 298–309. <https://jurnal.polkesban.ac.id/index.php/jks/article/view/2388>
- Rahman, I. W., Arfani, N., & Tadoda, J. V. (2023). Deteksi Bakteri MRSA *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* pada Sampel Darah Pasien Rawat Inap. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*, 14(1), 48–54. <http://journal.unhas.ac.id/index.php/jai2/article/view/26212>

- Sandra, S., Rustiati, E. L., Srihanto, E. A., Wahyuningsih, S., Priyambodo, P., Pratiwi, D. N., Febriansyah, M., Lestari, S. W., Winarno, W., Thesalonika, N., Mayda, M. A., Andriyani, Y., Afandi, A., Lidya, A., Permatasari, N., & Suhada, S. (2025). Uji Keberhasilan Amplifikasi Gen *N-Methyltransferase* pada Kopi Robusta di Perkebunan Kopi Rakyat Lembah Gunung Betung, Bogorejo, Lampung. *Jurnal Pendidikan Biologi*, *10*(2), 1021–1026. <https://e-journal.my.id/biogenesis>
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, *4*(1), 36–40. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>
- Siswanto, Putri, Y., Merdekawati, Fusvita, Ernawati, Hardiana, Acep T, Kurniawan, & Entuy. (2020). Optimasi Suhu *Annealing* dan Konsentrasi Primer untuk Deteksi *Brugia malayi* Menggunakan *Real-Time PCR*. *Jurnal Riset Kesehatan*, *11*(1), 314–321. <https://doi.org/10.34011/juriskesbdg.v11i1.1791>
- Sugireng, & Rosdarni. (2020). Deteksi MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) dengan Metode PCR pada Pasien Ulkus Diabetikum. *Prosding Seminar Nasional Biologi*, 31–35. <https://doi.org/10.24252/psb.v6i1.15232>
- Susanti, M. A., Mahardhika, G. S., Rujito, L., Darmawan, A. B., & Anjarwati, D. U. (2020). The Examination of *mecA* Gene in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) and Inappropriate Antibiotic Uses of Healthcare Workers and Communities in Banyumas. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, *11*(3), 257–265. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol11.iss3.art7>
- Syaniar, R., Farisida, Luhur, R., Malayanti, Siswanti, R. T., Asmawati, W. O., & Farida, I. (2024). Edukasi Pencegahan dan Tatalaksana MRSA pada Tenaga Kesehatan. *Jurnal Abdimas Kedokteran dan Kesehatan*, *2*(1), 42–47. <https://doi.org/10.24853/jaras.2.1.42-47>
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. N. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). *Anterior Jurnal*, *17*(2), 136–143. <https://doi.org/10.33084/anterior.v17i2.12>
- Wijayanti, T. R. A., & Safitri, R. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* Linn) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Penyebab Infeksi Nifas. *Care: Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, *6*(3), 277–285. <https://doi.org/10.33366/cr.v6i3.999>
- Yuenleni. (2019). Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, *1*(3), 51–56. <https://doi.org/10.22146/ijl.v1i3.48723>