

Deteksi MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) dengan Metode PCR Pada Pasien Ulkus Diabetikum

SUGIRENG¹, ROSDARNI²

¹Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis STIKES Mandala Waluya Kendari
Jl. Jend. AH. Nasution Kendari, Indonesia. 93561
Email: sugireng92@gmail.com

²Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis STIKES Mandala Waluya Kendari
Jl. Jend. AH. Nasution Kendari, Indonesia. 93561
Email: rosdarni@gmail.com

ABSTRACT

One of the complications of diabetes mellitus is ulcers, which is a superficial infection of the patient's skin caused by bacteria. *Staphylococcus aureus* is a bacteria that can infect wounds in people with diabetic ulcers. Currently, *S. aureus* is found to be resistant to methicillin class of antibiotics, also known as MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*). This study aims to detect the presence of the *mecA* gene, which encodes a region coding for resistance to the *S. aureus* bacteria that infects diabetic ulcer patients. This research was conducted in 3 stages. Taking wound swab samples from diabetic ulcer patients, culture on MSA media, DNA isolation process, PCR process and electrophoresis and documentation with doc transluminator gel. Based on the results of research on 8 patients with diabetic ulcers, the results showed that all samples were declared to have been infected with *Staphylococcus aureus* who had experienced resistance to the methicillin class of antibiotics with the formation of DNA bands at a size of 533 bp.

Keywords: diabetic ulcers; *mecA*; MRSA; PCR

INTISARI

Salah satu komplikasi diabetes melitus adalah ulkus yaitu terjadi infeksi superfisial pada kulit penderita yang disebabkan oleh bakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri yang dapat menginfeksi luka pada penderita ulkus diabetikum. Saat ini *S. aureus* banyak ditemukan mengalami resisten terhadap antibiotik golongan methicilin atau disebut dengan MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen *mecA* yang merupakan gen pengkode daerah yang mengalami resistensi pada bakteri *S. aureus* yang menginfeksi pasien ulkus diabetikum. Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan yaitu pengambilan sampel *swab* luka pasien ulkus diabetikum, kultur pada media MSA, proses isolasi DNA, proses PCR dan elektroforesis serta dokumentasi dengan *gel doc* transluminator. Berdasarkan hasil penelitian pada 8 pasien penderita ulkus diabetikum diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa semua sampel dinyatakan sudah terinfeksi *Staphylococcus aureus* yang sudah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan methicilin dengan terbentuknya pita DNA pada ukuran 533 bp.

Kata kunci: MRSA; *mecA*; PCR; ulkus diabetik

PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan serangkaian gangguan metabolik menahun akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin, sehingga menyebabkan kekurangan insulin baik absolut maupun relatif, akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah. Salah satu komplikasi diabetes melitus adalah ulkus yaitu terjadi infeksi superfisial pada kulit penderita yang disebabkan oleh bakteri. Pasien dengan penyakit diabetes melitus yang mempunyai luka terbuka akan lebih rentan mengalami infeksi karena mempunyai daya tahan tubuh yang lemah dan adanya gula darah yang tinggi

menjadi nutrisi dan tempat pertumbuhan bakteri (Yosmar *et al.*, 2018). Salah satu bakteri yang dapat menginfeksi luka diabetes adalah *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dengan disertai abses bernanah. Jenis bakteri yang paling banyak ditemukan dalam pus ulkus diabetikum yaitu *Staphylococcus sp* (92,9%) (Nur & Marissa, 2016).

Bakteri *S. aureus* adalah salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada berbagai jaringan tubuh pada penderita ulkus diabetikum. Infeksi *Staphylococcus* dapat ditularkan dari orang ke orang. Bakteri *S.*

aureus yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik dikenal dengan MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*). Mieke (2008) menyatakan bahwa resistensi suatu bakteri dapat terjadi karena pemberian antibiotik yang tidak tepat dosis, diagnosis yang salah, dan tidak tepat sasaran terhadap bakteri penyebabnya. Bakteri MRSA akan membentuk protein transmembran yang dikenal dengan protein efluks dan plasmid yang mengkode gen resisten terhadap suatu antibiotik.

Bakteri MRSA mengalami resistensi antibiotik disebabkan oleh perubahan genetik yang disebabkan terapi antibiotik yang bersifat tidak rasional. Transmisi bakteri berpindah dari satu pasien ke pasien lainnya melalui alat medis yang tidak diperhatikan sterilitasnya, melalui udara maupun fasilitas rumah sakit. Infeksi MRSA telah menjadi suatu masalah yang besar bagi klinisi di rumah sakit selama bertahun-tahun sebagai penyebab infeksi nosokomial yang angka kejadiannya meningkat 10-20% setiap tahunnya (Dudy, 2009). Sejak munculnya kasus resistensi terhadap antibiotik metisilin, bakteri MRSA dikenal secara luas sebagai penyebab bakteremia, pneumonia, infeksi pascaoperasi serta infeksi nosokomial lainnya. Bakteri MRSA dapat menyebabkan infeksi pada kulit, tulang, paru-paru, jantung atau infeksi sistemik. Infeksi MRSA hanya dapat diobati dengan antibiotik tertentu. Apabila antibiotik yang diberikan tidak mampu membunuh MRSA, infeksi tidak teratasi dan menyebar luas serta membahayakan nyawa penderitanya (Mieke, 2008). Infeksi oleh MRSA juga sudah mulai meluas di rumah sakit seperti infeksi MRSA pada luka bekas operasi. Dengan meluasnya infeksi MRSA, maka alternatif diagnostik dini spesifik MRSA (Anti-MRSA) sangat dibutuhkan. Salah satu teknik diagnostik yang cepat dan akurat yaitu dengan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan mendeteksi gen spesifik MRSA yaitu gen *mecA* (Al-Ruaily & Khalil, 2011).

Deteksi penyakit MRSA secara molekuler yang dilakukan dengan PCR memiliki kelebihan yaitu dapat mengidentifikasi gen virulen *S. aureus*. Pendeteksian MRSA dilakukan pada sampel pasien ulkus diabetikum agar dapat diketahui

secara dini apakah pasien terinfeksi MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) atau MSSA (*Methicilin Sensitive Staphylococcus aureus*). Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kesalahan pemberian antibiotik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat yaitu pengambilan sampel dilakukan di RSUD Kota Kendari dan deteksi molekuler dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Diagnostik Molekuler Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis. Variabel dalam penelitian ini yaitu deteksi gen *mecA* sebagai variabel terikat dan pasien ulkus diabetikum sebagai variabel bebas. Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif dan eksplorasi yaitu eksplorasi bakteri *S. aureus* yang tergolong MRSA dari pasien diabetes melitus dengan luka ulkus di RSUD Kota Kendari.

Data yang digunakan pada penelitian ini yaitu terdiri dari data primer dan sekunder. Data primer diperoleh dari hasil penelitian di Laboratorium, sedangkan data sekunder diperoleh dari data pasien yang dijadikan sampel. Untuk data primer diperoleh dengan melakukan prosedur kerja sebagai berikut:

1. Pemilihan dan pengambilan sampel klinis

Sampel yang digunakan yaitu *swab* dari bekas luka pasien diabetes. Sampel diambil dengan menggunakan *swab* steril yang dilengkapi dengan media transfer yang akan dibawa ke Laboratorium Diagnostik Molekuler untuk dianalisis.

2. Tahapan kultur bakteri *S. aureus*

Sampel *swab* luka ulkus yang diperoleh dikultur pada media spesifik *S. aureus* yaitu menggunakan media MSA (*Mannitol Salt Agar*). Sampel dikultur menggunakan metode gores kuadran (*streak plate*). Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Positif *S. aureus* apabila terbentuk koloni berwarna kuning.

3. Tahapan ekstraksi DNA

DNA dari sampel *swab* luka diekstraksi menggunakan gSYNC™ DNA Extraction Kit. Proses ekstraksi dimulai dengan tahap pemecahan sel menggunakan 10 µl proteinase K dan diinkubasi pada suhu 60°C selama

30 menit. Kemudian ditambahkan 200 µl GSB Buffer dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Tahapan kedua yaitu pengikatan DNA (*DNA Binding*), dilakukan dengan menambahkan 200 µl etanol absolut ke tabung sampel dan vortex selama 10 detik sampai tidak terbentuk endapan. Sampel lalu dipindahkan ke *GS column* dan disentrifuge pada 14.000xg selama 1 menit. *GS column* dipindahkan ke tabung 2 ml yang baru. Tahapan ketiga yaitu proses pencucian (*wash*) yang dilakukan dengan penambahan 400 µl W1 Buffer ke *GS column* dan disentrifuge pada 14.000xg selama 30 detik. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 µl dari *Wash Buffer* dan disentrifugasi pada 14.000xg selama 30 detik, supernatan dibuang dan pindahkan kembali ke *GS column*. Tahap terakhir yaitu proses elusi yang dilakukan dengan memindahkan *GS Column* kering ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml yang bersih dan ditambahkan 100 µl *Elution Buffer* yang dipanaskan sebelumnya. Menambahkan TE Buffer atau aquabides ke dalam *center* dari matriks kolom dan disentrifugasi pada 14.000xg selama 30 detik untuk mengelusi DNA yang dimurnikan (*Geneaid Instruction Manual*).

4. Proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan elektroforesis

Hasil ekstraksi DNA kemudian diamplifikasi menggunakan gen *mecA* yang dilakukan di dalam suatu reaksi PCR. Reaksi PCR dibuat dengan membuat *master mix* yang terdiri atas primer *mecA forward* [5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'], dan primer *mecA reverse* [5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3'] dan sampel DNA.

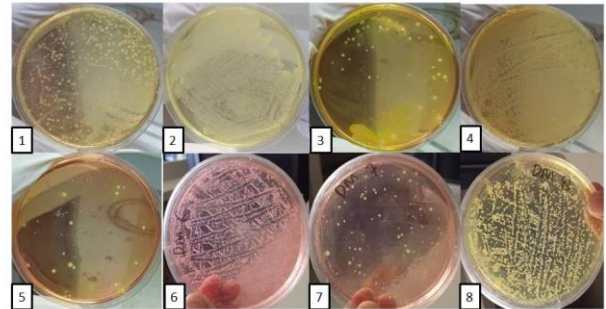
5. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis gel

Produk amplifikasi DNA kemudian dielektroforesis pada 1,5% agarosa yang dilarutkan dalam 1.0X TBE (Tris-borat-EDTA) pada tegangan 80 volt selama 30 menit. Produk divisualisasi menggunakan UV *Transilluminator*. Adanya pita DNA dengan berat molekul antara 533 bp menunjukkan bahwa sampel tersebut terdapat gen *mecA* atau positif terinfeksi bakteri MRSA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Hasil Kultur *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan hasil kultur pada media spesifik MSA (*Mannitol Salt Agar*) menunjukkan bahwa semua sampel swab luka dari pasien diabetes positif terdapat bakteri *S. aureus*. Hasil kultur dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil kultur swab sampel luka ulkus diabetikum pada Media MSA

(Ket: 1-8 adalah hasil kultur swab pasien yang berbeda)

Berdasarkan hasil pada Gambar 1, ditemukan 8 sampel positif *S. aureus*. Hal ini ditandai dengan tumbuhnya koloni bakteri yang berwarna kuning. Perubahan warna ini terjadi karena adanya fermentasi manitol menjadi asam. Produk yang dihasilkan bakteri ini adalah asam organik yang mengubah indikator pH di media MSA, mengubah warna merah media MSA menjadi kuning cerah (Rahmi *et al.*, 2015). Media MSA mengandung konsentrasi garam NaCl yang tinggi (7,5%-10%) sehingga membuat MSA menjadi media selektif untuk *Staphylococcus*, karena tingkat NaCl yang tinggi menghambat bakteri yang lain tumbuh (Boerlin *et al.*, 2003).

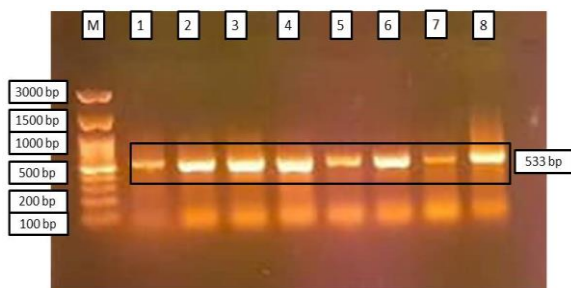
Berdasarkan hasil tersebut maka didapatkan bahwa bahwa semua sampel luka pada pasien diabetes terinfeksi bakteri *S. aureus*. Hal ini sesuai dengan penelitian Nur & Marissa (2017) yang menyatakan bahwa jenis bakteri yang paling banyak ditemukan dalam pus ulkus diabetikum berturut-turut adalah *Staphylococcus* sp.(92,9%), *Klebsiella* sp. (75,4%), *Proteus* sp. (73,7%), *Shigella* sp. (68,4%), *Escherichia coli* (42,1%), dan *Pseudomonas* sp. (10,5%).

Bakteri *Staphylococcus* paling banyak menginfeksi luka ulkus pada pasien diabetes.

Hal ini dikarenakan luka ulkus terbuka sehingga bakteri dengan mudah menginfeksi luka tersebut. Selain itu, dikarenakan pasien yang menderita diabetes memiliki kadar glukosa yang tinggi sehingga menjadi nutrisi dan habitat bagi bakteri untuk berkembangbiak. Menurut Casqueiro *et al.* (2012), meningkatnya kadar glukosa dalam darah pada penderita diabetes mellitus menyebabkan peningkatan substrat bakteri.

Identifikasi Bakteri MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) dengan PCR

Bakteri *S. aureus* yang positif secara kultur dari delapan sampel kemudian diidentifikasi secara molekular menggunakan gen *mecA* untuk mengetahui apakah bakteri *S. aureus* yang menginfeksi luka pada pasien diabetes mengalami resistensi pada antibiotik golongan metisilin. Berdasarkan hasil deteksi gen *mecA* pada 8 sampel diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa semua sampel terdeteksi positif adanya gen *mecA*. Hasil deteksi sampel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil deteksi gen *mecA* pengkode gen resistensi antibiotik metisilin pada bakteri *S. aureus* dari luka pasien ulkus diabetikum

Berdasarkan hasil deteksi gen *mecA* pada isolat bakteri *S. aureus* dari luka pasien ulkus diabetikum menggunakan metode PCR yang digunakan untuk mengonfirmasi adanya bakteri MRSA, dengan melihat amplifikasi dari gen *mecA* yang memiliki afinitas tinggi terhadap metisilin. Metode ini mempunyai kelebihan yaitu memiliki spesifisitas yang tinggi dalam sekali proses deteksi. Teknik ini banyak diaplikasikan untuk deteksi virus, bakteri dan agen infeksi lainnya (Noor, 2018). Primer *mecA* forward: 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3' dan Primer *mecA*

reverse: 5'-AGT TGT GCA GTA CCG GAT TTG C-3' yang merupakan primer untuk mendeteksi bakteri MRSA berukuran 533 bp (Radji *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil visualisasi hasil amplifikasi gen *mecA* pada Gambar 2 menunjukkan terbentuknya pita DNA pada ukuran 533 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa dari 8 bakteri *S. aureus* terdeteksi memiliki gen *mecA*. Seluruh sampel (100%) positif memiliki pita DNA 533 bp yang berarti seluruh isolat tersebut memiliki gen *mecA*. Hal ini menunjukkan bahwa semua pasien ulkus diabetikum sudah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan metisilin. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Ruben *et al.* (2017) yang mendeteksi gen *mecA* dari MRSA dengan ukuran 533 bp.

Gen *mecA* merupakan pengkode resistensi antibiotik dari *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik metisilin. Antibiotik metisilin membunuh bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri. *S. aureus* berubah menjadi galur resisten metisilin (MRSA) karena mendapat sisipan suatu elemen DNA berukuran besar antara 20-100 kb yang disebut *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). SCC*mec* ini mengandung *mecA* yaitu gen yang menyandi PBP2a yang mendasari resistensi MRSA (Arai *et al.*, 2002; Parvez *et al.*, 2008). Resistensi MRSA terhadap antimikroba golongan metisilin disebabkan bakteri ini memiliki protein mutan *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a atau PBP 2') yang disandi oleh gen *mecA*. PBP merupakan suatu kelompok enzim pada membran sel *S. aureus* yang mengkatalisis reaksi transpeptidasi guna pembentukan anyaman (*cross-linkage*) rantai peptidoglikan. Afinitas PBP2a terhadap antimikroba golongan Betalaktam sangat rendah sehingga MRSA akan tetap hidup meskipun terpapar antimikroba tersebut dalam konsentrasi tinggi (Felten *et al.*, 2002).

Gen yang mengkode PBP2 berubah menjadi PBP2a sehingga reseptor sisi aktif bagi antibiotik Betalaktam tersebut tidak dikenali lagi (Satari, 2010). Mekanisme pengalihan resistensi antibiotik adalah melalui kaset *Staphylococcus* kromosom (SCC), DNA bergerak spesifik untuk *Staphylococcus* yang

telah melalui evolusi molekuler untuk pertukaran informasi geneti antarsesama. Isolat yang memiliki gen *mecA* dan positif pada PCR, tidak harus menyiratkan bahwa bakteri secara fenotipik adalah MRSA, karena ada kemungkinan di mana produk gen tidak terekspresikan (Kaur *et al.*, 2012).

Gaol, YEL., Erly dan Elmatris. 2017. Pola resistensi bakteri aerob beberapa antibiotika di laboratorium mikrobiologi RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua pasien penderita ulkus diabetikum di RSUD Kota Kendari sudah terinfeksi *S. aureus* yang sudah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan metisilin atau disebut bakteri MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada STIKES Mandala Waluya Kendari yang telah membiayai penelitian ini dan kepada LPPM STIKES Mandala Waluya yang telah memberikan pelayanan kepada kami selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ruaily, MA and Khalil, OM. 2011. Detection of (*mecA*)gene in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A/Rhman Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. *Journal of Medical Genetics and Genomics*. vol. 3(3): 41-45.
- Alexander, A. 2008. Hospital-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ohio-USA: Kenyon College.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D. and Schaellibaum, M. 2003. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*. vol 41(2): 767-771. doi: 10.1128/JCM.41.2.767-771.2003.
- Casqueiro, J., Casqueiro, J and Alves, C. 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. vol 16(1): S27-S36. doi: 10.4103/2230-8210.94253.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. Profil Kesehatan Indonesia 2007. Jakarta: Depkes RI.
- Dudy, D. 2009. Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pada Kasus Infeksi Luka Pascaoperasi di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Kariadi Semarang. [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro.