

## Deteksi Gen *nuc* Isolat Bakteri *Staphylococcus aureus* dari Pasien Ulkus Diabetikum dengan Metode PCR

SUGIRENG<sup>1</sup>, ROSDARNI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Mandala Waluya  
Jl. Jend. AH. Nasution Kendari, Indonesia. 93561

Email: [sugireng92@gmail.com](mailto:sugireng92@gmail.com)

<sup>2</sup>Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Mandala Waluya  
Jl. Jend. AH. Nasution Kendari, Indonesia. 93561

Email: [rosdarni@gmail.com](mailto:rosdarni@gmail.com)

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the bacteria that can cause infection in various body tissues in diabetic ulcer patients. The prevalence of *S. aureus* infection, therefore, a specific early diagnostic alternative for *S. aureus* is urgently needed. One of the fast and accurate diagnostic techniques is to use PCR (polymerase chain reaction) by detecting a specific gene for *S. aureus*, namely the *nuc* gene. This study aims to detect the presence of the *nuc* gene which is the gene encoding the production of *Tnase* (*Thermonuclease*) of *S. aureus* bacteria that infect wounds in diabetic patients, documented with a UV transluminator. Based on the results of the study, there were 2 samples of bacterial isolates of diabetic ulcer patients, namely sample 1 and sample 4. Both samples had the *nuc* gene which was characterized by the formation of a 278 bp DNA band.

Keywords: diabetic ulcers; *nuc*; PCR; *Staphylococcus aureus*

### INTISARI

Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada berbagai jaringan tubuh pada penderita ulkus diabetikum. Meluasnya infeksi *S. aureus*, maka alternatif diagnostik dini spesifik *S. aureus* sangat dibutuhkan. Salah satu teknik diagnostik yang cepat dan akurat yaitu dengan menggunakan PCR (*polymerase chain reaction*) dengan mendeteksi gen spesifik *S. aureus* yaitu gen *nuc*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen *nuc* yang merupakan gen pengkode produksi *Tnase* (*Thermonuclease*) bakteri *S. aureus* yang menginfeksi luka pada pasien diabetes. Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan yaitu pengambilan sampel swab luka pasien ulkus diabetikum, proses isolasi DNA, proses PCR dan elektroforesis serta didokumentasikan dengan UV transluminator. Berdasarkan hasil penelitian dihasilkan dari 2 sampel isolat bakteri pasien ulkus diabetikum yaitu sampel 1 dan sampel 4. Kedua sampel memiliki gen *nuc* yang ditandai dengan terbentuk pita DNA ukuran 278 bp.

Kata kunci: *nuc*; PCR; *Staphylococcus aureus*; ulkus diabetikum

### 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 superficial 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* 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. Pengobatan ulkus dengan infeksi bakteri kultur positif dianjurkan dengan pemberian antibiotik. Antibiotik memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Infeksi *S. aureus* hanya

dapat diobati dengan antibiotik tertentu. Apabila antibiotik yang diberikan tidak mampu membunuh bakteri penyebab infeksi dengan tepat dan tepat sasaran serta pemberian antibiotik dalam waktu yang lama, maka akan menyebabkan bakteri tersebut bersifat resisten. Jika hal tersebut terjadi, infeksi tidak teratasi dan menyebar luas serta membahayakan nyawa penderitanya (Mieke, 2008).

Infeksi oleh *S. aureus* juga sudah mulai meluas di rumah sakit. Dengan meluasnya infeksi *S. aureus*, maka alternatif diagnostik dini spesifik *S. aureus* sangat dibutuhkan. Salah satu teknik diagnostik yang cepat dan akurat yaitu dengan menggunakan PCR (*polymerase chain reaction*) dengan mendeteksi gen spesifik *S. aureus* yaitu gen *nuc* (Al-Ruaily & Khalil, 2011).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif yaitu mendeteksi gen *nuc* bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode molekular yaitu PCR. Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat yaitu pengambilan sampel dilakukan di RSUD Kota Kendari dan deteksi molekular dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Diagnostik Molekular Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis. Variabel dalam penelitian ini yaitu deteksi gen *nuc* sebagai variabel bebas dan pasien ulkus diabetikum sebagai variabel terikat.

Penelitian ini terdiri atas tiga tahapan prosedur yaitu persiapan sampel, proses isolasi DNA, proses PCR dan elektroforesis. Tahapan tersebut diuraikan 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 Molekular untuk dianalisis.

### 2. 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 dalam tabung sampel dan *vortex* selama 10 detik sampai tidak terbentuk endapan. Sampel lalu dipindahkan ke GS column dan disentrifugasi pada 14,000x g selama 1 menit. GS column dipindahkan ke tabung 2 ml yang baru. Tahapan ketiga yaitu proses pencucian (*Wash*) yang dilakukan dengan menambahkan 400 µl W1 Buffer ke GS column dan disentrifugasi pada 14,000 x g selama 30 detik. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 µl dari *Wash Buffer* dan diseentrifugasi pada 14,000 x g 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, TE Buffer atau aquabides ke dalam *center* dari matriks kolom dan disentrifugasi pada 14,000 x g selama 30 detik untuk mengelusi DNA yang dimurnikan (*Geneaid Instruction Manual*).

### 3. 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'], *nuc forward* [5' TCAGCAAATGCATCACAACAG-3'], primer *nuc reverse* [5' CGTAAATGCACTTGCTTCAGG- 3'] dan sampel DNA.

### 4. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis gel

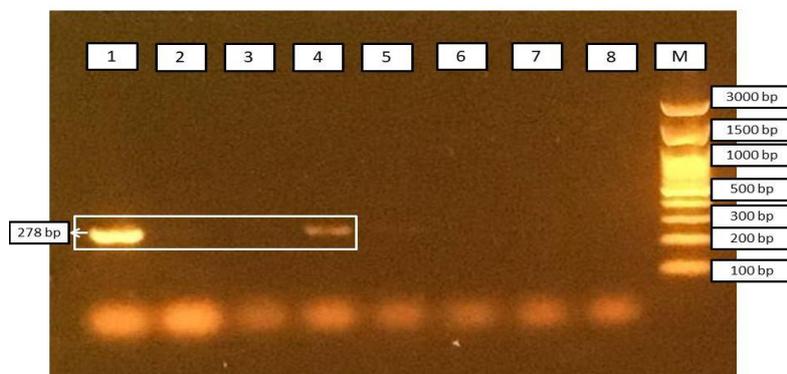
Produk amplifikasi DNA kemudian dielektroforesis pada 1.5% agarosa yang dilarutkan dalam 1.0X TBE (Tris-borat-EDTA). pada tegangan 80 volt selama 30 menit. Produk divisualisasi menggunakan UV *Transilluminator*. Adanya pita DNA dengan

berat molekul antara 278 bp menunjukkan bahwa pada sampel tersebut terdapat gen *nuc*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang positif secara kultur dari delapan sampel pada penelitian Sugireng & Rosdarni (2020), kemudian diidentifikasi secara molekular menggunakan gen *nuc* untuk mengetahui gen pengkode produksi Tnase (*Thermonuclease*) bakteri *S. aureus* yang menginfeksi luka pada

pasien diabetes. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa deteksi *S. aureus* dengan menggunakan PCR amplifikasi gen *nuc* memiliki potensi besar untuk digunakan untuk diagnosis cepat *S. aureus* (Kateete *et al.*, 2010; Gaol *et al.*, 2011; Banada *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil deteksi gen *nuc* pada delapan isolat dihasilkan dua sampel (isolat 1 dan isolat 4) terdeteksi positif adanya gen *nuc* pada ukuran 278 bp. Hasil deteksi sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil deteksi gen *nuc* bakteri *S.aureus* dari luka pasien ulkus diabetikum.  
Keterangan: M: Marker; 1-8: Kode sampel isolat bakteri *S.aureus*

Berdasarkan hasil deteksi gen *nuc* pada isolat bakteri *S. aureus* dari luka pasien ulkus diabetikum menggunakan metode PCR yang digunakan untuk mengonfirmasi gen yang mengkode nuklease termotabil dari *S. aureus* dihasilkan pita DNA pada ukuran 278 bp. Menurut Kemalputri *et al.* (2017) pita DNA untuk gen *nuc* terlihat di antara 200bp dan 300 bp. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Chai *et al.* (2020) dalam mendeteksi keberadaan gen *nuc* dari *S. aureus* dari sampel susu kambing mentah dengan ukuran 278 bp. Selain itu, Pondit *et al.* (2018) juga berhasil mendeteksi gen *nuc* pada ukuran 279 bp pada kulit telur ayam dan puyuh. Pada Penelitian Wahyuni *et al.* (2009), primer oligonukleotida sintesis 21 dan 24 basa, digunakan dalam PCR untuk mengamplifikasi sekuen gen *nuc*, gen yang mengkode nuklease termotabil dari *Staphylococcus aureus*.

Beberapa penelitian menggunakan gen *nuc* untuk mendeteksi adanya gen termotabil dari *Staphylococcus aureus*. Pada Penelitian Pondit *et al.* (2018) menyatakan dari

tujuh *S. aureus* koagulase-positif, gen *nuc* dikonfirmasi hadir dalam empat (57,14%) isolat. Enam isolat resisten oksasilin, tiga di antaranya (50%) mengandung gen *mecA*. Dalam penelitian lain, Sadeghi & Mansouri (2014) melaporkan bahwa 162 isolat *S. aureus* dikonfirmasi untuk hadir dengan gen *nuc*, di antaranya 56,8% adalah MRSA.

Pada penelitian ini semua isolat bakteri (sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8) positif memiliki gen *mecA* dan hanya 2 isolat bakteri (sampel 1 dan 4) yang positif memiliki gen *nuc*. Gen *nuc* merupakan gen yang mengkode Tnase (*Thermonuclease*), yaitu berupa enzim yang bersifat termotabil atau tahan pada suhu tinggi. *S. aureus* menghasilkan *thermostable nuclease* ekstraseluler yang dikode oleh gen *nuc*. Gen *nuc* merupakan salah satu karakteristik yang paling membedakan dan paling spesifik untuk dapat membedakan *S. aureus* dengan jenis *Staphylococcus spp.* yang lain (Sahebnasagh *et al.*, 2014).

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 melitus menyebabkan peningkatan substrat bakteri.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini ditemukan dua isolat bakteri *Staphylococcus aureus* (isolat 1 dan 4) yang positif terdeteksi adanya gen *nuc* yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA pada ukuran 278 bp.

## UCAPAN TERIMA KASIH

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

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ruaily, M.A., and Khalil, O.M., 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.
- Banada, P. P., S. Chakravorty, D. Shah, M. Burday, F. M. Mazzella, & D. Alland. 2012. Highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* directly from patient blood. *PLoS ONE*. vol. 7(2): 1-7.
- 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.
- Chai, M. H., T. A. M. Faiq, S. M. Z. Ariffin, Z. Suhaili, M. Z. Sukiman, & M. F. Ghazali. 2020. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in raw goat milks from selected farms in Terengganu, Malaysia. *Tropical Animal Science Journal*. vol. 43(1): 64-69.
- Gaol, Y.E.L., Erly., & Elmatris. 2017. Pola resistensi bakteri aerob beberapa antibiotika di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2011. *Jurnal Kesehatan Andalas*. vol. 6(1): 164-170.
- Kateete, D.P., C.N. Kimani, F.A. Katabazi, A. Okeng, M.S. Okee, A. Nanteza, M.L. Joloba, & F.C. Najjuka. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. vol. 9(23): 1-7.
- Mieke, H.S. 2008. *Multidrug Resistance (MDR) Bakteri terhadap Antibiotik*. Semarang: FKG Universitas Padjajaran.
- Nur, A., & Marissa, N., 2016. Gambaran bakteri ulkus diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Meuraxa tahun 2015. *Jurnal Penelitian Kesehatan*. vol. 44(3): 187–196.
- Pondit, A., Haque, Z.F., Sabuj, A.A., Khan, S.R., & Saha, S., 2018. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and quail eggshell. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. vol 5(4): 466–471.
- Sugireng & Rosdarni. 2020. Deteksi MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) dengan metode PCR pada pasien ulkus diabetikum. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. vol 6(1): 31-35.
- Wahyuni, Endang & Irawati, S. 2009. Deteksi gen *nuc Staphylococcus* dan *elt Escherrichia coli* pada susu segar di DIY dan Jawa Tengah. [Tesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada