

DETEKSI GEN *Coa* PADA METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Zainab Rosalina¹, Sri Darmawati², Muhammad Evy Prastiyanto³

¹Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

²Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

³Laboratorium Biologi Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

Info Artikel

Keywords :

Methicillin Resistant
Staphylococcus aureus
(MRSA), gen *Coa*

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini untuk mendeteksi gen *Coa* pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Sampel dalam penelitian ini adalah empat sampel bakteri MRSA (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4). Deteksi gen *Coa* : 1) Isolasi DNA bakteri MRSA dengan metode *Chelating Ion Exchange Resin* (Chelex). 2) Amplifikasi gen *Coa* dengan metode PCR menggunakan primer spesifik Forward (5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3') dan primer Reverse (5'GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3'). 3) Visualisasi hasil PCR dengan metode Elektroforesis gel Agarose. Hasil penelitian menunjukkan bahwa empat sampel bakteri MRSA (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4) positif memiliki gen *Coa* yang berukuran 756 bp.

Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang paling utama di negara-negara berkembang, termasuk di Indonesia. Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme patogen (Wikantayasa, 2015). Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Mariati, 2013), salah satu contoh bakterinya yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Gama, 2017).

Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi karena mampu berkembang biak dan menyebar luas di dalam jaringan tubuh karena mampu menghasilkan enzim koagulase (Wahyuni *et al*, 2017). Gen penyandi enzim koagulase (*Coa*) dapat digunakan sebagai

penanda adanya bakteri *S. aureus* (Fatimah, 2012).

Salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* dapat ditanggulangi dengan penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat akan menimbulkan berbagai dampak negatif seperti timbulnya kekebalan bakteri terhadap beberapa antibiotik. Bakteri *S. aureus* sudah banyak mengalami resistensi terhadap penggunaan beberapa antibiotik, salah satunya adalah *S. aureus* yang resisten terhadap methicillin (MRSA) dan golongannya karena adanya modifikasi pada protein pengikat penicillin (Dewanti, 2015).

Corresponding Author:

Sri Darmawati

Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: Ciciekdarma@unimus.ac.id

Protein ini berperan untuk mengkode peptidoglikan transpeptidase baru yang mempunyai afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam dan non- β -laktam, sehingga terapi antibiotik golongan β -laktam dan non- β -laktam menjadi tidak efektif karena bakteri akan tetap hidup meskipun terpapar antimikroba dalam konsentrasi tinggi (Dewanti, 2015).

Menurut penelitian Güler *et al.* (2005), bahwa distribusi gen *Coa* *S. aureus* isolat dari bovine kasus mastitis klinis sebesar 83,3%, tidak semua isolat *S. aureus* memiliki gen *Coa*, dan menurut penelitian Kenar (2016) distribusi gen *Coa* *S. aureus* isolat dari bovine kasus mastitis subklinis memiliki gen *Coa* sehingga perlu dilakukan penelitian tentang deteksi gen *Coa* pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan adalah plasma citrat, ddH₂O, saponin 0,5% dalam PBS 1x, *Phosphate Buffer Lysis*, 20% Chelex, Tris Borat EDTA (TBE) Buffer, PCR Mix, dan gel agarosa 2%.

Bakteri Uji

Sampel dalam penelitian ini adalah 4 isolat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4) dari Semarang pada bulan Agustus 2018.

Metode

Uji Koagulase

Uji koagulase metode slide dilakukan diatas objek glass ditambahkan plasma sitrat dan 1 koloni bakteri. Hasil positif ditandai dengan adanya butiran pasir, terjadi koagulase plasma yang mengandung protein yang digumpalkan oleh enzim koagulase dalam bakteri,

setelah didapatkan hasil uji koagulase dilanjutkan penanaman ke media HIA dan siap dilanjutkan ketahap selanjutnya.

Deteksi Gen *Coa*.

Metode isolasi DNA genom bakteri menggunakan *Promega kit*. Ambil bakteri MRSA sebanyak 50 μ l lalu dimasukkan dalam mikrotube yang berisi 100 μ l ddH₂O dan 1 ml saponin 0,5% dalam PBS 1x kemudian didiamkan selama semalaman pada suhu 4°C. Campuran yang sudah diinkubasi, disentrifuge 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pellet ditambah 1 ml *Phosphate Buffer Lysis* kemudian sentrifuge 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatannya dibuang lalu ditambahkan 100 μ l ddH₂O dan 50 μ l 20% Chelex, campuran di vortex. Setelah itu campuran itu direbus pada suhu 95°C selama 10 menit dan divortex kembali selama 5 menit. Campuran kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan kedalam mikrotube kemudian disimpan pada suhu -20°C. Ini merupakan stok DNA untuk dilanjutkan ke tahap kuantifikasi DNA.

Uji kuantifikasi DNA dilakukan untuk mengetahui tingkat kemurnian dan jumlah DNA yang didapatkan dari tahap isolasi dan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode spektrofotometri. Menurut Suharsono dan Widyastuti (2006) sampel diukur Optical density (OD) atau absorbansinya pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian DNA yang bagus adalah 1,8-2,0.

Reaksi PCR menggunakan design primer *Coa Forward* (5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3') dan primer *Coa Reverse* (5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3') dengan hasil produk PCR 756 bp. Reaksi PCR juga dibuat dalam total volume 50 μ l. Komponen reaksi PCR adalah primer F

5 µl, primer R 5 µl, 25 µl PCR mix, ddH₂O 5 µl, dan template DNA 10 µl. Campuran yang dihasilkan lalu dihomogenkan dan di spin. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 kali. Siklus PCR dengan denaturasi awal pada temperatur 94°C selama 45 detik, denaturasi selanjutnya dengan temperatur 94°C selama 20 detik, annealing dengan temperatur 57°C selama 15 detik, ekstensi awal dengan temperatur 72°C selama 15 detik dan ekstensi terakhir pada suhu 72°C selama 2 menit, dengan siklus amplifikasi sebanyak 30 kali. Elektroforesis dilakukan untuk melihat profil pita DNA yang sesuai pada medium gel agarosa 2% dengan cara ditimbang sebanyak 0,5 gr lalu dilarutkan dalam 20 ml TBE buffer.

Agarose dipanaskan didalam *microwave*. Kemudian dituang kedalam pencetak gel yang telah dipasangkan sisiran, tunggu hingga mengeras. Setelah mengeras, sisir pencetak dilepaskan dengan hati-hati. Masukkan gel pada chamber elektroforesis. Pada sumur pertama diinjeksikan Ladder marker 100 bp sebanyak 5 µl dan sumur kedua diinjeksikan DNA sampel sebanyak 10 µl DNA. Hasil amplifikasi di elektroforesis pada gel agarosa 2% dengan 1x TBE buffer dengan 100 V selama 20 sampai 25 menit dan kuat arus 400 mA. Gel dilepas

kemudian diwarnai dengan ethidium bromide dan difoto di bawah transillumination UV.

Hasil

Hasil Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan cara mengekstraksi bakteri MRSA dengan menghancurkan dinding sel bakterinya, kemudian dilakukan kuantifikasi DNA untuk mengetahui tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA yang menggunakan panjang gelombang (*Optical Density/OD*) 260 nm dan 280 nm (Tabel 3).

Berdasarkan pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dari hasil ekstraksi DNA dengan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) pada panjang gelombang (*Optical Density/OD*) 260 nm dan 280 nm, konsentrasi DNA tertinggi pada sampel Sa1 sebesar 57,72 ng/µl dan konsentrasi DNA terendah pada sampel Sa2 sebesar 26,18 ng/µl. Hasil kemurnian DNA pada sampel bakteri MRSA pada penelitian ini sebesar 2,09. Sampel pada penelitian ini masih memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu tahap amplifikasi DNA dengan teknik PCR untuk deteksi gen Coa.

Tabel 1. Hasil Kuantifikasi DNA pada empat sampel bakteri MRSA

No	Kode Sampel	Kemurnian DNA 260/280 nm	Konsentrasi DNA ng/µl
1.	Sa1	2,32	57,72 ng/µL
2.	Sa2	1,86	26,18 ng/µL
3.	Sa3	2,06	51,45 ng/µL
4.	Sa4	2,12	47,70 ng/µL

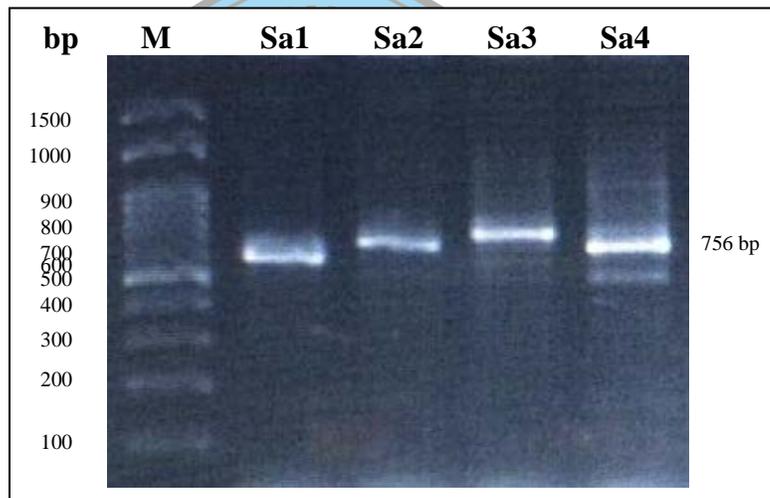
4.1.3. Hasil Amplifikasi Gen *Coa* Menggunakan Teknik PCR

Tahap selanjutnya setelah dilakukan kuantifikasi DNA adalah dengan melakukan amplifikasi gen *Coa* menggunakan teknik PCR menggunakan primer *Coa Forward* (5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3') dan primer *Coa Reverse* (5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3').

Program PCR ada 3 tahap yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi. Denaturasi awal dengan suhu 94°C selama 45 detik, denaturasi selanjutnya dengan

suhu 94°C selama 20 detik, annealing dengan suhu 57°C selama 15 detik, ekstensi awal dengan suhu 72°C selama 15 detik dan ekstensi terakhir pada suhu 72°C selama 2 menit, dengan siklus amplifikasi sebanyak 30 kali. Visualisasi hasil PCR ditunjukkan pada gambar 3.

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa deteksi gen *Coa* dengan teknik PCR dari 4 isolat sampel bakteri MRSA (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4) adalah positif gen *Coa*. Hasil positif ditandai dengan munculnya fragmen DNA yang berukuran 756 bp.



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR pada agarose 2%

Diskusi

Tahap awal yang perlu dilakukan untuk mengidentifikasi genotipik bakteri adalah dengan mengisolasi atau mengekstraksi DNA bakteri MRSA. Secara umum proses ekstraksi DNA dibagi menjadi beberapa tahap yaitu persiapan materi yang akan digunakan, proses penghancuran sel, penghilangan senyawa kontaminan, dan pengumpulan DNA. Hasil isolasi DNA bakteri MRSA yang diperoleh diukur kemurnian dan konsentrasinya dengan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop 2000

(Thermo Scientific). Berdasarkan pengukuran Spektrofotometer pada panjang gelombang (*Optical Density/OD*) 260 nm dan 280 nm, hasil isolasi DNA dari 4 isolat MRSA menghasilkan larutan DNA dengan kemurnian 2,09.

Panjang gelombang 260 nm dapat mendeteksi nilai absorbansi cahaya yang dapat diterima oleh molekul DNA, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm yang terdeteksi adalah protein (Sambrook *et al*, 1989). Perbandingan nilai yang kurang dari 1,8 menunjukkan

preparasi DNA terkontaminasi oleh protein dan nilai yang lebih dari 2,0 terkontaminasi oleh RNA (Sambrook *et al*, 1989). Berdasarkan hasil kuantifikasi DNA didapatkan DNA yang murni pada sampel Sa2, sedangkan pada sampel Sa1, Sa3, dan Sa4 terdapat kontaminasi RNA. Sampel pada penelitian ini masih memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu tahap amplifikasi DNA dengan teknik PCR untuk deteksi gen *Coa*.

Deteksi gen *Coa* dengan teknik PCR didapatkan hasil dari 4 isolat bakteri MRSA (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4) menunjukkan positif dijumpai gen *Coa*. Hasil positif ditandai dengan adanya fragmen DNA yang berukuran 756 bp. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa berat molekul gen *Coa* pada sampel bakteri MRSA berukuran 756 bp (Hookey *et al*, 1998 ; Anggaraini *et al*, 2017), sedangkan hasil penelitian Lusiastuti *et al* (2008) menunjukkan bahwa isolat *S. aureus* yang didapat dari peternakan Surabaya dan sekitarnya adalah 16 isolat dengan pendekatan genotipik memakai berat molekul 680 bp positif gen penyandi koagulase (*Coa*) dan hasil penelitian Saputra (2014) yang mana amplifikasi dari 26 sampel bakteri *S. aureus* positif memiliki gen *Coa* dengan variasi ampikon sampel positif memiliki produk 695 bp yang menggunakan susunan primer yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa hasil amplifikasi dari gen *Coa* pada bakteri MRSA berada pada 650-900 produk PCR dari referensi dan *database GeneBank*.

Gen *Coa* adalah suatu gen penyandi enzim koagulase dan penanda adanya bakteri *S. aureus*. Diantara genus *Staphylococcus* hanya *S. aureus* yang memproduksi koagulase (*Coa*) dan dapat digunakan untuk membedakan *S. aureus* dari *Staphylococcus* lainnya (Fatimah,

2012). Gen *Coa* bertanggung jawab dalam mengekspresikan protein, dan protein tersebut yang berfungsi sebagai enzim koagulase (Da silva *et al*, 2005). Hasil uji koagulase dengan metode slide dari ke empat sampel bakteri MRSA positif. Hal ini menunjukkan bahwa ke empat sampel bakteri MRSA tersebut menghasilkan enzim koagulase yang dikode oleh gen *Coa*.

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian tentang deteksi gen *Coa* pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), dari 4 isolat MRSA (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4) yang dideteksi gen *Coa* dengan metode PCR menunjukkan hasil positif gen *Coa* dengan berat molekul 756 bp. Untuk peneliti selanjutnya dapat dikembangkan dengan memperbanyak jenis sampel *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik lain, contohnya *vancomycin*. Untuk peneliti selanjutnya dapat dikembangkan dengan melakukan penelitian mengenai gen lainnya seperti gen *mecA* menggunakan sampel bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Referensi

- Anggraini AD, Khoendori EB, Pramono H, dan Wahyono DJ, 2017. Polymorphism Analysis of the Coagulase Gene in Isolates of *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* with AluI Restriction Sites. Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
- Da Silva, E.R. and N. Da Silva, 2005. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Canadian*

- Journal of veterinary Research*. 69: 260-264.
- Dewanti, MC. 2015. Efektivitas Kombinasi Minyak Sereh (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) Dengan Antibiotik Eritromisin, Streptomisin, Kloramfenikol, dan Siprofloksasin Dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus*. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Fatimah, I. 2012. Daya Hambat Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Karya Tulis Ilmiah, FIKKES, Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Gama RA, Warganegara E, Aprilia E, dan Soleha TU, 2017. Perbandingan Efektifitas Antibakteri Ekstrak Bintang Laut (*Culcita* sp.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Güler, L.Ü. Ok, K. Gündüz, Y. Gülcü, and H. H. Hadimli., 2005. Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. Departments of Microbiology, Veterinary Control and Research Institute, Konya, Turkey.
- Hookey J.V, Richardson J.F, Cookson B.D. 1998. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of Clinical Microbiology*;36(4): 1083–1089.
- Kenar B, Bagcigil AF, Kuyucuoglu Y, Kahraman BB, Konak S., 2017. Antimicrobial Susceptibility Profiles and Coagulase Gene Polymorphism of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis. *Kafkas University Vet Fak Derg*, 23 (4): 535-540.
- Lusiastuti, AM. 2008. Penggunaan Polymorphism Gen Penyandi Koagulase Sebagai Pelacak Variabilitas Genetik *Staphylococcus aureus*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mariati, D. 2013. Potensi isolat *Actinomyces* Dari Rizosfer Padi (*Oryza sativa* L.) Sebagai Penghasil Antibiotik. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Sambrook, J, EF. Fritch dan T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual Vol 1-3 second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Saputra, ILM. 2014. Deteksi *Staphylococcus aureus* Koagulase Positif Dan *Staphylococcus aureus* Koagulase Negatif Dari Susu Serta Analisis Gen Koagulase (*Coa*). Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Suharsono dan Widyastuti, U, *Penuntun praktikum pelatihan teknik pengklonan gen*. Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.

Wahyuni, RA, Darmawati S, Prastiyanto ME. 2017. Deteksi Gen *Coa* Pada *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Susu Sapi Murni. FIKKES, Universitas Muhammadiyah Semarang.

Wikantyasa, A. 2015. Uji Susceptibilitas *Mycobacterium* Non

Tuberculosis Tipe Rapidly Growing Terhadap Gentamisin Dan Levofloksasin Secara In Vitro. Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

