DETEKSI BAKTERI Pseudomonas aeruginosa ISOLAT PUS LUKA BERBASIS POLYMERASE CHAIN REACTION DENGAN TARGET GEN PENGKODE FLAGELIN fliC

by Sofyan Yosias Beslar

Submission date: 18-Jan-2023 10:35PM (UTC+0700)
Submission ID: 1994792306
File name: 2022_Prosiding_Semnas_Sofyan_Yosias.pdf (532.86K)
Word count: 4354
Character count: 25861

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

DETEKSI BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ISOLAT PUS LUKA BERBASIS *POLYMERASE CHAIN REACTION* DENGAN TARGET GEN PENGKODE FLAGELIN *fliC*

Detection of Pseudomonas aeruginosa of Wound Pus Isolate Based on Polymerase Chain Reaction Targeting Flagellin Coding Gene fliC

Sofyan Yosias Beslar[1], Stalis Norma Ethica[2], Mutia Srikandi Fitria[1], Aditya Rahman Ernanto[1]

[1] Program Studi DIV Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang.

[2] Program Studi S2 Ilmu Laboratorium Klinis, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

Corresponding author: norma@unimus.ac.id

Abstrak

Luka merupakan keadaan rusak atau hilangnya jaringan tubuh yang diakibatkan adanya suatu faktor yang mengganggu sistem perlindungan tubuh. Faktor tersebut seperti perubahan suhu, trauma, zat kimia, ledakan, sengatan listrik, atau gigitan hewan. Luka terbuka lebih mudah di kolonisasi oleh berbagi macam organisme. Mikroorganisme penyebab radang adalah golongan kuman piogenik. Infeksi piogenik adalah infeksi yang ditandai dengan terbentuknya peradangan lokal yang parah dan kadang terjadi pembentukan pus (nanah). Kelompok kuman piogenik terdiri dari banyak spesies salah satunya yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* adalah bakteri yang berbentuk batang Gram negatif, bersifat aerob, dan bergerak dengan menggunakan flagel. Tujuan penelitian adalah mendeteksi keberadaan gen *fliC* pada *P. aeruginosa* isolat pus luka dengan menggunakan metode berbasis PCR. Jenis penelitian ini adalah penelitian empiris didukung eksperimen dan studi pustaka. Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil subkultur atau peremajaan isolat yang telah tersimpan di Laboratorium Mikrobiologi Univeristas Muhamadiyah Semarang. Isolat tersebut berasal dari anak laki – laki berusia 5 tahun yang mengalami luka akibat tusukan dan telah mengeluarkan pus. Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi serta uji biokimia, diperoleh isolat bakteri murni yaitu : BP-1. Isolat BP-1 diisolasi dan identifikasi berbasis molekuler dengan cara isolasi DNA, PCR, *elektroforesis*, sekuensing yang kemudian diproses program BLAST. Isolat BP-1 memiliki kekerabatan dengan bakteri *P. aeruginosa* strain DVT779 dengan tingkat kemiripan sebesar 99.36%. Berdasarkan hasil tersebut maka isolat BP-1 teridentifikasi sebagai *P. aeruginosa* strain BP-1.

Kata Kunci : Luka , *Pseudomonas aeruginosa*, Gen *fliC*

Abstract

Wound is a broke or lose of body tissue caused by a factor that interferes the body's protective system. The factors are temperature changes, trauma, chemicals, explosions, electric shocks, or animals bite. Open wounds are more easily colonized by a variety of organisms. Microorganisms that cause inflammation are pyogenic bacteria. Pyogenic infection is an infection that characterized by the formation of severe local inflammation and sometimes make a formation of pus. The group of pyogenic bacteria consists of many species, one of which is Pseudomonas aeruginosa. P. aeruginosa is a gram negative, rod shaped bacterium, aerobic and moves by using a flagellum. The aim of this study is detection the present of fliC gene in P. Aeruginosa isolates of wound pus by using a PCR method. The type of this study is empirical supported by experiments and literature studies. The isolate of bacterium that used in this study was the result of

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

subculture and rejuvenation of isolate, then stored in the microbiology laboratory of university of Muhammadiyah Semarang. Isolate originated by 5-year-old boy and had wound caused by stabbed and produce the pus. Based on the results of isolation, identification and the biochemical test of bacteria, the pure bacterium was obtained, namely: BP-1. The BP-1 isolate was isolated and identified with molecular test by DNA isolation, PCR, electrophoresis, and sequencing followed by the BLAST program. The BP-1 isolate was related to the bacterium P. aeruginosa strain DVT779 and the similarity degree was 99.36%. Based on the results, the isolate BP-1 was identified as P. aeruginosa strain BP-1.

Keywords : *Wound, Pseudomonas aeruginosa, fliC* Gene

PENDAHULUAN

Luka merupakan keadaan rusak atau hilangnya jaringan tubuh yang disebabkan oleh faktor pengganggu sistem perlindungan tubuh. Faktor tersebut misalnya perubahan suhu, trauma, zat kimia, ledakan, sengatan listrik, atau gigitan hewan (Suryadi *et al*., 2013)

Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018, tiga urutan terbanyak jenis cedera yang dialami penduduk Indonesia berdasarkan proporsi cedera yang mengakibatkan kegiatan sehari-hari terganggu (pada semua umur) adalah luka lecet/lebam/memar (64,1%), terkilir (32,8%) dan luka iris/robek/tusuk (20,1%). (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018)

Bentuk luka berbeda-beda tergantung penyebabnya, ada yang terbuka dan tertutup. Luka terbuka lebih mudah di kolonisasi oleh berbagi macam organisme. Mikroorganisme penyebab radang adalah golongan kuman piogenik. Infeksi piogenik adalah infeksi yang ditandai dengan terbentuknya peradangan lokal yang parah dan kadang terjadi pembentukan pus (nanah). Golongan kuman piogenik terdiri dari banyak spesies yang menyebar luas di tubuh manusia. Salah satunya yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Ekawati *et al*., 2018)

P. aeruginosa adalah bakteri yang berbentuk batang Gram negatif, bersifat aerob, dan bergerak dengan menggunakan flagel. Bakteri ini bersifat patogen oportunistik dimana dapat menyebabkan infeksi pada mata, telinga (otitis eksternal), kulit, tulang, sistem saraf pusat, saluran pencernaa, jantung (endocarditis), saluran kemih, sistem pernafasan dan sistem peredaran pada darah (bakterimia dan septikemia) (Milanda *et al*., 2014).

Kultur bakteri masih menjadi *gold standard* pada teknik deteksi konvensional untuk mendeteksi bakteri namun, identifikasi isolat bakteri yang spesifik yaitu menggunakan deteksi molekuler. Metode diagnostik molekuler yang biasa digunakan yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan salah satu metode deteksi molekuler berbasis DNA yang paling popular. PCR menggunakan metode enzimatis untuk amplifikasi DNA secara *in vitro* (Ethica *et al*., 2013). Keunggulan dari Teknik PCR karena

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

teknik yang pengerjaannya efektif, cepat, akurat, efisien, sensitivitas dan spesifisitas tinggi dan dapat mendiagnosis mikroorganisme dalam skala kecil seperti bakteri (Marzony *et al*., 2016).

Penelitian terkait deteksi *P. aeruginosa* berbasis PCR menggunakan gen *fliC* pada isolat pus luka masih jarang dilaporkan. Deteksi bakteri kaitannya dengan eradikasi penyakit sangat penting. Selain itu gen *fliC* menyandi flagela polar yang tersusun atas unit protein (flagellin) yang dimiliki oleh *P. aeruginosa* dan merupakan salah satu faktor virulensi. Flagela bertanggung jawab atas patogenisitas, kemotaksis dan kolonisasi bakteri ke sel inang (Lillehoj *et al*., 2002).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang isolasi bakteri *P. aeruginosa* pada isolat pus luka. Selain itu juga perlu dilakukan identifikasi bakteri *P. aeruginosa* berbasis gen *fliC* untuk dapat mengetahui identitas dan taksonomi dari bakteri tersebut.

METODE

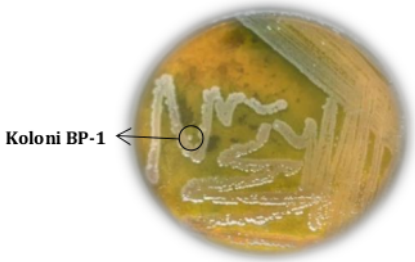
Jenis penelitian ini adalah adalah penelitian empiris yang di dukung eksperimen dan studi pustaka. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei – Juli 2022 di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah (Unimus) Semarang. Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil subkultur atau peremajaan isolat yang telah tersimpan di Laboratorium Mikrobiologi Unimus. **Subkultur**: Isolat bakteri ditanam ke media *Brain Heart Infusion Bro*th (BHIB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. **Isolasi dan Purifikasi**: Isolat yang tumbuh di media BHIB di isolasi ke media *Mac Conkey Agar* (MCA) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh diamati makroskopis meliputi bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, ukuran dan elevasi koloni. **Pewarnaan gram**: Koloni yang tumbuh dilakukan pewarnaan gram. Hasil indikasi pewarnaan yaitu bakteri gram negatif akan berwarna merah dan bakteri gram positif akan berwarna violet . **Uji Biokimia**: Koloni dilakukan uji biokimia meliputi Indol, *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), Citrat, Motilitas, Urea dan *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) diikubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. **Ekstraksi DNA**: Dilakukan dengan cara mengambil koloni pada media MCA kemudian diisolasi kemedia BHIB 15 ml diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC. Isolasi DNA genom dilakukan dengan protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam *Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. **Pemurnian dan Konsentrasi DNA**: Hasil ekstraksi DNA berupa DNA Genom diuji kemurniannya pada spektrofotometer *NanoDrop.* TE digunakam sebagai larutam blangko, kemudian di masukkan 2 µL sampel yang akan diukur kemurnian dan konsentrasinya. **Amplifikasi PCR dan Elektroforesis**: Total volume campuran bahan pada proses PCR yaitu 25 µl

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

terdiri dari 12,5 µl *master mix*, *forward primer*: GGCAGCTGGTTNGCCTG *reverse primer*: GGCCTGCAGATCNCCAA masing-masing 2 µl, DNA *template* 2 µl dan *nuclease free water* 6,5 µl. Pengaturan program PCR yaitu *pradenaturation* 95ºC 1 menit, *denaturation* 95ºC 30 detik, *annealing* 57°C 1 menit, *extention* 72°C 1 menit jumlah siklus sebanyak 35 kali, *Final Extention* 72ºC 1 menit dan *Cooling down* 4°C. Hasil PCR dielektroforesis pada gel *agarose* 2% dengan mencampur 8 µl produk PCR dengan 2 µl *loading dye*, pengaturan tegangan 50vvolt selama 75 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan *UV Transiluminator*. **Sekuensing dan Analisa BLAST**: Pada tahap sekuensing dengan metode Sanger, produk PCR dikirim ke PT. *Genetika Science* Tangerang. Analisis hasil sekuen dilakukan menggunakan *software* DNA *Base Assembeler* yang selanjutnya data dicocokkan dengan data di Genbank dengan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

HASIL DAN PEMBAHASAN

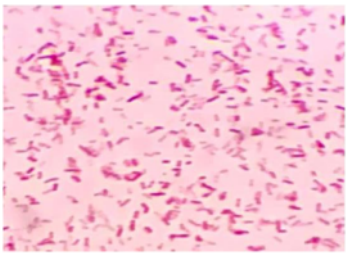
Gambar 1.
Hasil purifikasi Isolat bakteri BP 1 pada media McConkey Agar (MCA)



Hasil isolasi dan purifikasi ditunjukkan pada Gambar 1. Koloni tampak berbentuk *Circullar* (bulat) berwarna kehijauan, berukuran sedang dan memiliki margin atau tepi yang *Undulate* atau tidak merata, bentuk elevasi *Convex* atau cembung dan konsistensi yang *smooth* atau halus dan bersifat *non lactose fermented* atau tidak memecah laktosa.

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Gambar 2.
Hasil pewarnaan Gram Isolat bakteri BP-1 (*Boy's Pus* 1)



Pada Gambar 2 menunjukkan hasil pengecetan Gram bakteri Isolat BP-1 yang diperiksa dengan mikroskop optik (pembesaran 1000x) untuk mengamati bentuk sel dan formasi koloni bakteri diperoleh isolat BP-1 merupakan bakteri berbentuk basil, berwarna merah susunannya soliter dengan hasil pengecatan Gram negatif.

Tabel 1.
Hasil Uji Biokimia pada bakteri Isolat BP-1(*Boy's Pus* 1)

Uji Biokimia	**Hasil**
Indol	-
MR	-
VP	-
Sitrat	+
Motilitas	+
Urea	-
TSIA	K/K; H_2S-; Gas $-$
Glukosa	-
Laktosa	-
Sukrosa	-

Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil uji biokimia pada isolat BP-1 Positif pada uji Sitrat dan Motilitas, Negatif pada uji Indol, MR, VP, Urea, Glukosa, Laktosa, Sukrosa dan hasil uji TSIA K/K H_2S-; Gas $-$. Ini menunjukkan bahwa isolate BP-1 memiliki kemiripan karakteristik biokimia dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

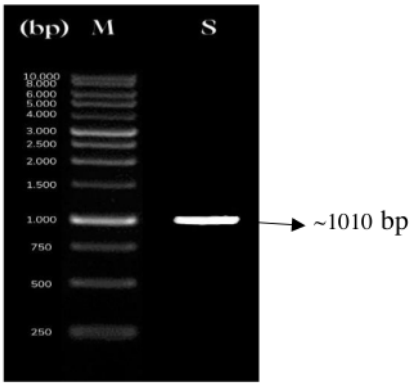
e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Tabel 2.
Kemurniaan dan Konsentrasi Ekstrak DNA Bakteri isolat BP-1(*Boy's Pus* 1)

Kode Sampel	Konsentrasi DNA (ng/µl)	Kemurnian λ260/A280
BP-1	145,85	1,931

Pada penelitian ini diperoleh nilai kemurnian DNA BP-1 adalah 1,931 dan konsetrasi 145,85 ng/ml (Tabel 1). Nilai kemurnian tersebut masih masuk ke dalam *range* kemurniaan DNA yang baik sehingga dapat digunakan untuk amplifikasi DNA pada PCR.

Gambar 3.
Visualisasi pita DNA hasil amplifikasi PCR. Keterangan M = (marker 1000 bp), *S* =(Isolat BP-1)

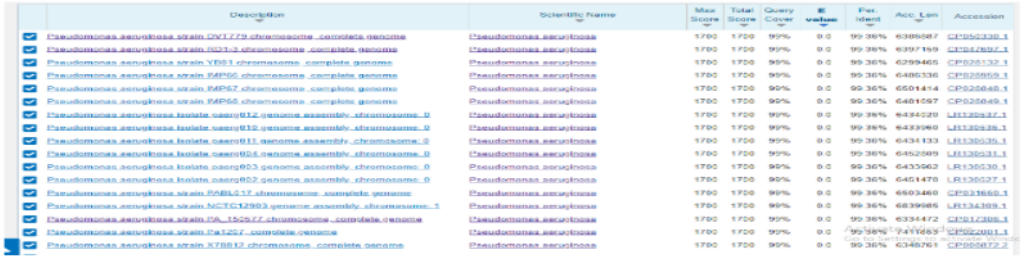


Gambar 3 merupakan hasil amplifikasi PCR gen *fliC* menggunakan *elektroforesis* dengan gel *agarose* 2% yang divisualisasikan menggunakan *UV Transilumunator*. Berdasarkan hasil *elektroforesis* pada kolom S dihasilkan pita jelas, tebal dan tunggal dan setelah diukur dengan marker yang digunakan isolat BP-1berukuran ~1010 bp.

Proses sekuensing DNA dilakukan dengan bantuan pihak ketiga yaitu PT. *Genetika Science* Indonesia yang berada di Tangerang. Kemudian sekuens gen *fliC* dari kedua primer *forward* dan *reserve* disejajarkan. Tahap *editing* sekuen ini dilakukan dengan bantuan software *DNABase*. Hasil analisis sekuens *consensus* gen *fliC* dilacak kesamaan atau homologi terhadap sekuens *fliC* milik bakteri yang lain pada *GenBank* dengan program BLAST pada https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Gambar 4.
Hasil BLAST produk amplifikasi PCR gen *fliC* Strain BP-1(*Boy's Pus* 1)



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pseudomonas aeruginosa strain DV1779 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6388587	CP050330.1
Pseudomonas aeruginosa strain RD1-3 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6397169	CP047697.1
Pseudomonas aeruginosa strain YR31 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6299465	CP028132.1
Pseudomonas aeruginosa strain P4P56 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6486336	CP025668.1
Pseudomonas aeruginosa strain P4P67 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6501414	CP025648.1
Pseudomonas aeruginosa strain P4P68 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6481097	CP025649.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg012 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6434020	LR130537.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg010 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6433940	LR130536.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg011 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6434133	LR130535.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg004 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6452509	LR130531.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg003 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6433962	LR130530.1
Pseudomonas aeruginosa isolate paerg002 genome assembly, chromosome: 0	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6451470	LR130527.1
Pseudomonas aeruginosa strain PABL017 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6503460	CP031660.1
Pseudomonas aeruginosa strain NCTC12903 genome assembly, chromosome: 1	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6839985	LR134309.1
Pseudomonas aeruginosa strain PA_152577 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6334472	CP017305.1
Pseudomonas aeruginosa strain Pa1227, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6411665	CP022001.1
Pseudomonas aeruginosa strain X78812 chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1700	1700	99%	0.0	99.36%	6348761	CP050872.2

Berdasarkan hasil pensejajaran sekuen DNA menggunakan BLAST pada Gambar 4 menunjukkan bahwa Isolat BP-1memiliki homogenitas dengan *P. aeruginosa* strain DV1779 dengan *max score* 1700, *total score* 1700, *query cover* 99%, *e. value* 0.0, *per. Ident* 99.36% dan *accession* CP050330.1. yaitu 65.3˚C.

Hasil isolasi bakteri pada media MCA dimana sampel di beri kode BP-1 memiliki jenis koloni yang berbentuk *Circullar* (bulat) dengan warna kehijau-hijauan, berukuran sedang dan memiliki margin atau tepi yang *Undulate* atau tidak merata, memiliki bentuk elevasi *Convex* atau cembung dan konsistensi yang *smooth* atau halus dan bersifat *non lactose fermented* atau tidak memecah laktosa. *P.aeruginosa* memiliki 2 tipe pigmen yaitu: *pyoverdin* atau pigmen fluoresens berwarna hijau dan *pyocyanin* yang berwarna biru (Rollando, 2019)

Pada hasil pewarnaan gram sesuai pada Gambar 2 Isolat BP-1 merupakan bakteri gram negatif bentuk batang. Bakteri Gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, peptidoglikan pada dinding sel bakteri Gram negatif hanya memiliki ketebalan 10% dari total susunan yang ada pada dinding sel bakteri, sehingga mudah melepas zat pewarna kristal violet dan bakteri hanya mengikat zat pewarna safranin (Hamidah *et al*., 2019).

Pada uji biokimia, hasil uji indol negatif dengan tidak terbentuk cincin ungu, hal ini berarti bakteri tidak dapat memproduksi enzim *tryptophanase* yang akan memecah *tryptophan* menjadi indol. Hasil Uji MR menunjukkan negatif yaitu tidak terjadinya perubahan warna pada media biakan bakteri setelah diteteskan *methyl red* sebanyak 3-5 tetes. Uji MR dipakai untuk menunjukkan adanya fermentasi asam campuran, dimana bakteri bisa memfermentasi glukosa dan memproduksi produk yang bersifat asam sehingga dapat menurunkan pH media pertumbuhan menjadi lebih rendah. Sedangkan pada uji VP menunjukkan hasil negatif dengan tidak terjadinya perubahan warna media biakan setelah ditambahkan α naftol dan KOH 40% sebanyak 3-5 tetes (Rapi *et al*., 2017)

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Hasil uji sitrat pada sampel menunjukkan hasil positif karena terjadinya perubahan warna menjadi biru, artinya bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber energinya. Pada uji motilitas di dapatkan hasil positif. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya penyebaran garis pada daerah inokulasi, uji motilitas positif karena adanya penyebaran pertumbuhan pada garis tusukan yang ada di media SIM. Bakteri yang bersifat motil memiliki flagella sehingga pertumbuhannya akan menyebar (Ullah *et al*., 2021). Hasil uji urea pada sampel menunjukkan hasil negatif karena pada media tidak terjadi perubahan warna menjadi warna merah jambu atau pink. Uji urea bertujuan untuk mengetahui adanya enzim urease pada bakteri yang dapat digunakan untuk menguraikan urea membentuk amoniak. (Antriana, 2014).

Pada uji TSIA bagian *butt* (tusuk) dan *slant* (miring) tidak terjadi perubahan warna merah hal ini disebabkan karena bakteri jenis ini tidak mampu memfermentasikan laktosa, dekstrosa dan sukrosa pada media TSIA (Sayuti dan Suratni, 2015). Pada uji TSIA juga tidak terbentuk gas H2S. Indikasi terbentuknya gas H2S ditandai dengan terbentuknya gelembung pada media atau media dalam tabung terangkat ke atas. Pada uji gula-gula (glukosa, sukrosa dan laktosa) tidak terjadi perubahan warna media dari merah ke kuning, artinya bakteri tersebut tidak membentuk asam dari fermentasi karbohidrat (Rahmadian *et al*., 2018).

Isolasi ekstrak DNA menggunakan *Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Penggunaan Kit ekstraksi memiliki keunggulan yaitu pengerjaannya lebih mudah, memerlukan waktu yang cepat, dan DNA yang dihasilkan lebih tebal. Kemurnian DNA berada pada rasio perbandingan λ260/A280 nm antara 1,8 – 2,0 (Ernanto *et al*., 2018). Pada penelitian ini sampel BP-1 menunjukkan hasil murni dengan nilai kemurnian sebesar 1,931 dan konsentrasi 145,85. Jika hasil λ260/A280 nm diperoleh di bawah 1,8, maka DNA hasil ekstraksi terjadi kontaminasi protein atau fenol. Sedangkan, Jika hasil λ260/A280 nm diperoleh lebih dari 2,0, maka DNA hasil ekstraksi memiliki kontaminasi RNA (Kurnia *et al*., 2021).

Isolat DNA yang telah murni kemudian di PCR menggunakan *forward primer* GGCAGCTGGTTNGCCTG dan *reverse primer*: GGCCTGCAGATCNCCAA dengan suhu *annealing* 57°C. Pada tahap *annealing* suhu menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi. Apabila suhu terlalu tinggi mengakibatkan gagalnya amplifikasi karena tidak terbentuk penempelan primer sebaliknya apabila suhu terlalu rendah mengakibatkan primer menempel pada sisi lain genom akibatnya DNA yang terbentuk mempunyai spesifisitas rendah (Ludyasari *et al*., 2015).

Isolat DNA yang telah di PCR dilanjutkan dengan *elektroforesis* gel *agarose* 2%. Konsentrasi *agarose* yang dipakai akan menentukan besarnya pori-pori gel yang akan memisahkan DNA. Semakin rendah konsetrasinya maka matriks pada gel akan kecil sehingga fragmen DNA akan terpisah semakin menjauh berdasarkan ukurannya .

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Beberapa faktor yang menentukan keberhasilan dari proses *elektroforesis* yaitu komposisi buffer *elektroforesis*, ukuran molekul DNA, konsentrasi gel *agarose*, penggunaan pewarna DNA, konformasi DNA, dan voltase yang digunakan (Sinaga *et al*., 2017).

Pada Gambar 3 terlihat pola pita DNA hasil amplifikasi PCR yang terbentuk berupa pita tunggal dan tebal. Pita yang terang dan tebal menunjukkan konsentrasi DNA total tersebut besar serta memiliki DNA yang cukup untuk analisis sekuensing DNA dan akan memberikan hasil yang lebih akurat. Pita atau *band* DNA yang terbentuk terlihat tidak terdapat *smear* yang berarti memiliki kualitas sampel yang baik. Penyebab terjadinya *smear* adanya senyawa lain yang masih tersisah dari hasil ekstraksi, DNA yang terdegradasi, kandungan RNA hasil ekstraksi yang belum hilang sepenuhnya serta proses pemanasan dengan suhu yang tinggi (Sadikin *et al*., 2021).

Isolat bakteri dikirim ke PT. *Genetika Science* Indonesia di Tangerang untuk disekuensing dengan metode Samger. Sekuensing dilakukan untuk menerjemahkan deretan untai DNA agar menjadi basa-basa nukleotida seperti adenin, guanin, timin, sitosin (AGTC), proses sekuensing menggunakan metode Sanger. Metode ini memakai DNA cetakan dan membutuhkan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Panjang produk sekuen yang dihasilkan ~1.000 - 1.200 bp dan tidak mampu menghasilkan lebih dari 2.000 bp (Tasma, 2016). Dari hasil sekuensing diperoleh panjang basa Isolat Bakteri BP-1 ~1010 bp sedangkan penelitian sebelumnya yang sudah dilaporkan oleh *(*Ertugrul *et al*., 2017) diketahui gen *fliC* pada bakteri *P. aeruginosa* memiliki ukuran pita DNA ~1020 bp. Selisih dari pasang basa antara hasil sekuensing metode Sanger dengan ukuran Pita DNA yang sudah dilaporkan tersebut terjadi karena dalam proses pengolahan data hasil sekuensing adanya proses *trimming* (Gaffar *et al*., 2021).

Produk hasil sekuensing disebut dengan sekuen. Sekuens dianalisis dengan metode bioinformatika dengan cara penyejajaran (*alignment*). Hasil Penyejajaran dilakukan menggunakan *DNA Baser*, dengan menyejajarkan sekuen *forward* dan sekuen *reverse* dari sampel, sehingga didapatkan sekuen konsensus (*consensus sequence)*. Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di data base (Alfitri *et al*., 2022). Hasil yang diperoleh kemudian dicocokan kemiripannya untuk menentukan identitas gen dengan cara membandingkan sekuens sampel dengan sekuens DNA yang dimiliki oleh bakteri lain pada *BLAST* di NCBI (Ethica dan Raharjo, 2014).

Berdasarkan hasil pensejajaran sekuen DNA menggunakan program BLAST menunjukan bahwa sampel yang diteliti strain BP-1 (BP= *boy's pus* 1) memiliki *query cover* 99% dan *max Ident* 99.36 % dengan sekuen *Pseudomonas aeruginosa* strain DVT779 (kode akses CP050330.1). Hal ini menunjukkan bahwa sekuen memiliki homogenitas yang paling mirip dengan sekuen yang kita cari Nilai homolog pada

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

rentang 98% -100% memiliki homologi pada tingkat spesies, pada nilai 93-97 % memiliki homologi pada pada tingkat genus sedangkan nilai homologi < 91 % tidak akurat apabila dibandingkan dengan data yang ada pada *GenBank* (Bhattacharjee *et al*., 2012). Nilai *E- value* dari sekuen bernilai 0, artinya sekuen tersebut identik dengan sekuen yang kita cari tetapi jika nilainya 1 atau lebih, maka nilai tersebut tidak boleh digunakan (Sogandi, 2018). Apabila nilai *E-value* yang didapatkan semakin tinggi menunjukkan tingkat homolog antar sekuen semakin rendah sedangkan apabila nilai *E-value* yang didapatkan semakin rendah menunjukkan tingkat homolog antar sekuen semakin tinggi (Ihsan *et al*., 2020) .

Berdasarkan hasil tersebut, Isolat Bakteri BP-1 dapat dinyatakan sebagai bakteri *P. aeruginosa* berdasarkan untain basa pada gen *fliC*. Gen *fliC* menyandi flagela polar yang tersusun atas unit protein (flagellin) yang dimiliki oleh *P. aeruginosa* dan merupakan salah satu faktor virulensi. Flagela bertanggung jawab atas patogenisitas, kemotaksis dan kolonisasi bakteri ke sel inang (Lillehoj *et al*., 2002). Pada penelitian yang dilakukan oleh *(M et al*., 2018) di Iran menunjukkan bahwa prevalensi *P. aeruginosa* resisten terhadap *Carbapenems* yang mampu menghasilkan MBL (*Mettalo-Beta-Lactamase*) pada pasien di Rumah Sakit Golestan dan Imam Khomeini, Ahvaz, Iran yang positif, positif juga dalam hal keberadaan gen *fliC*. Sehingga dapat di simpulkan bahwa keberadaan flagela berperan cukup besar dalam virulensi bakteri.

Flagelin *flic* memiliki peran penting dalam merangsang respon imum dengan munculnya strain multi resisten, serta memberikan bukti pentingnya metode alternatif terapi antibiotik seperti vaksin rekombinan. Dengan demikian flagela dapat dikatakan sebagai kandidat vaksin. Vaksin bivalen flagela merupakan salah satu contoh yang telah diuji pada pasien dengan *cystic fibrosisis* dan memperoleh hasil yang memuaskan (Döring *et al*., 2007).

Oleh karena itu deteksi cepat *P. aeruginosa* dapat menjadi sangat penting dalam proses pengobatan karena flagella memiliki peran yang cukup besar dalam kolonisasi dan penyebab penyakit. Identifikasi *P. aeruginosa* melalui flagela dengan metode molekuler merupakan salah satu alternatif metode cepat untuk mendeteksi bakteri tersebut.

KESIMPULAN

Isolat bakteri yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Unimus yang diberi kode BP-1(*Boy's Pus*-1) diidentifikasi secara molekuler berbasis PCR menggunakan target gen *fliC* memiliki kemiripan tertinggi (99.36 %) dengan sekuen gen bakteri *P. aeruginosa* strain DVT779 (kode akses CP050330.1).

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

DAFTAR PUSTAKA

Alfitri, M., Abdullah, A., Nugraha, R., 2022. Identifikasi Spesies Ikan Hiu dan Pari pada Produk Olahan Ikan Asap dengan Metode DNA Barcoding. J. Pengolah. Has. Perikan. Indones. 25, 163–171. https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.38518

Antriana, N., 2014. Isolasi Bakteri Asal Saluran Pencernaan Rayap (*Macrotermes* spp.). Unej Volume16, hlm. 18 – 28.

Budi, I.M., Mawardi, A., 2021. Identifikasi Molekular Kekerabatan Genetik Kopi Wamena Berbasis Marka Random *Amplified of Polymorphic DNA* (RAPD). J. Biol. Papua 13, 8–18. https://doi.org/10.31957/jbp.1322

Döring, G., Meisner, C., Stern, M., 2007. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 11020–11025.https://doi.org/10.1073/pnas.0702403104

Ekawati, E.R., Husnul Y., S.N., Herawati, D., 2018. Identifikasi Kuman Pada Pus Dari Luka Infeksi Kulit. J. SainHealth 2, 31. https://doi.org/10.51804/jsh.v2i1.174.31-35

Ernanto, A.R., Afifah, D., Lesmana, I., Daryono, B.S., 2018. Isolation of DNA from chicken (G*allus gallus domesticus Linnaeus*, 1758) feather with lysis buffer-phenol chloroform isoamyl alcohol method (PCI) and chelex method. AIP Conf. Proc. 2002. https://doi.org/10.1063/1.5050098

Ertugrul, B.M., Oryasin, E., Lipsky, B.A., Willke, A., Bozdogan, B., 2017. Virulence genes *fliC*, *toxA* and *phzS* are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. Infect. Dis. (Auckl). 0, 1–7. https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1393839

Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, Semiarti, E., Widada, J., Raharjo, T.J., 2013. Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. Indones. J. Chem. 13, 248–253. https://doi.org/10.22146/ijc.21284

Ethica, S.N., Raharjo, T.J., 2014. Detection of Genes Involved in Glycerol Metabolism of *Alcaligenes* sp. JG3. Dr. Diss. Univ. Gadjah Mada.

Gaffar, S., Sumarlin, S., Haryono, M.G., Pidar, H., 2021. Penentuan Jenis dan Status Konservasi Pari Layang-Layang yang Didaratkan Di TPI Gunung Lingkas Kota Tarakan Dengan Pendekatan Molekuler. Biotropika J. Trop. Biol. 9, 80–87. https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2021.009.01.09

Hamidah, N.M., Rianingsih, L., Romadhon, 2019. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* Dan *S. aureus*. Jurna Ilmu dan Teknol. Perikan. 1, 11–20.

Ihsan, Y.N., Fellatami, K., Permana, R., Mulyani, Y., Pribadi, T.D.K., 2020. Analisis Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb(CH3COO)2 Menggunakan Gen 16S rRNA.

J. Kelaut. Indones. J. Mar. Sci. Technol. 13, 151–162. https://doi.org/10.21107/jk.v13i2.7285

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Tahun 2018, Kementerian Kesehatan RI.

Koentjoro, M.P., Maifanda, A.S., Febrianti, A.A., Zahra, N.I., Yuliawati, S., 2021. Teknik Diagnostik Konvensional dan Lanjutan Untuk Pemeriksaan Mikrobiologi pada Infeksi Nosokomial di Indonesia. J. Insa. Cendekia 8, 136–145.

Kurnia, R.R., Lesmana, I., Ernanto, A.R., Perdamaian, A.B.I., Trijoko, Daryono, B.S., 2021. The association of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene polymorphism of on egg productivity in hybrid chicken (*Gallus gallus gallus, Linnaeus* 1758). Biodiversitas 22, 1221–1226. https://doi.org/10.13057/biodiv/d220318

Lillehoj, E.P., Kim, B.T., Kim, K.C., 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 282, 751–756. https://doi.org/10.1152/ajplung.00383.2001

Ludyasari, A., Susilowati, R., Abidin, H.M., 2015. Pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah. Univ. Islam Maulana Malik Ibrahim 1, 1–10.

M, Moosavian, M, Moradzadeh, H, G., 2018. Typing of *fliC* gene in *Pseudomonas aeruginosa metallo-beta-lactamase* (MBL) producer strains isolated from Clinical specimens. Infect. Epidemiol. Microbiol. 4, 41–46. https://doi.org/10.29252/modares.iem.4.2.41

Marzony, I., Yani, F.Y., Efrida, 2016. Uji DIagnostik C-Reactive Protein pada Pnemonia Bakteri Komunitas Anak. Sari Pediatr. 17, 391–395. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14238/sp17.5.2016.391-395

Milanda, T., Dewi, L., Kusuma, S., 2014. Detection of Chloramphenicol Resistance Genes (*cat*) in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with Polymerase Chain Reaction Method. Indones. J. Clin. Pharm. 3, 141–150. https://doi.org/10.15416/ijcp.2014.3.4.141

Rahmadian, C.A., Ismail, Abrar, M., Erina, Rastina, Fahrimal, Y., 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan asin di tempat pelelangan ikan Labuan Haji Aceh Selatan. J. Jimvet 2, 493–502.

Rapi, D.H., Erina, Darniati, 2017. ISOLASI Dan Identifikasi *Pseudomonas* sp. Pada Telur Gagal Menetas Di Desa Garot Kecamatan Darul Imarah Aceh Besar. Jimvet 01, 19–23.

Rollando, 2019. Senyawa Anti Bakteri dari Fungi Endofit, Pertama. ed, CV. Seribu Bintang. CV. Seribu Bintang, Malang.

e-ISSN : 2654-3168
p-ISSN : 2654-3257

Sadikin, M.I., Swandari, T., Wilisiani, F., 2021. Optimasi Protokol Ekstraksi DNA Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada Umur Tanaman yang Berbeda. Semin. Nas. dalam Rangka Dies Natalis ke-45 UNS 5, 1379–1389.

Sayuti, I., Suratni, 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Limbah Cair Minyak Bumi GS Cevron Pasifik Indonesia di Desa Benar Kecamatan Rimba Melintang Rokan Hilir. Pros. Semirata 320–334.

Sendo, M.L., Mantiri, F.R., Rumondor, M.J., 2022. Isolation and Characterization of Potential Bacteria Degrading Used Machine Oil From Several Workshop Locations in Manado City. Pharmacon– Progr. Stud. Farm. Fmipa, Univ. Sam Ratulangi, 11, 1222–1230.

Sinaga, A., Putri, L.A.P., Bangun, M.K.B., 2017. Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer Opd 03, Opd 20, Opc 07, Opm 20, Opn 09. J. Agroekoteknologi Univ. Sumatera Utara 5, 55–64.

Sogandi, 2018. Biologi Molekuler: Identifikasi Bakteri Secara Molekuler. Universitas 17 Agustus 1945, Jakarta.

Suryadi, I.A., Asmarajaya, A., Maliawan, S., 2013. Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka. e-Jurnal Med. Udayana 2, 254–272.

Taariwuan, M.B., Ngangi, J., Mokosuli, Y., Gedoan, S., 2021. DNA Barcoding Dalugha (*Cyrtosperma Merkusii*) di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan Berdasarkan Gen rbcL. J. Bios Logos 11, 134. https://doi.org/10.35799/jbl.v11i2.34452

Tasma, I.M., 2016. Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom Untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. J. Penelit. dan Pengemb. Pertan. 34, 159. https://doi.org/10.21082/jp3.v34n4.2015.p159-168

Ullah, R., Qureshi, A.W., Sajid, A., Khan, I., Ullah, A., Taj, R., 2021. Percentage Incidences of Bacteria in Mahseer (*Tor putitora*), Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Fish Collected from Hatcheries and Local Markets of District Malakand and Peshawar of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. Brazilian J. Biol. 84, 2–7. https://doi.org/10.1590/1519-6984.251747

DETEKSI BAKTERI Pseudomonas aeruginosa ISOLAT PUS LUKA BERBASIS POLYMERASE CHAIN REACTION DENGAN TARGET GEN PENGKODE FLAGELIN fliC

ORIGINALITY REPORT

13%	15%	7%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	jim.unsyiah.ac.id Internet Source	3%
2	prosiding.unimus.ac.id Internet Source	2%
3	repository.ub.ac.id Internet Source	1%
4	digilib.uinsby.ac.id Internet Source	1%
5	idoc.pub Internet Source	1%
6	es.scribd.com Internet Source	1%
7	123dok.com Internet Source	1%
8	talenta.usu.ac.id Internet Source	1%
	nanopdf.com	

9	Internet Source	1 %

Exclude quotes	On	Exclude matches	< 30 words
Exclude bibliography	On		

DETEKSI BAKTERI Pseudomonas aeruginosa ISOLAT PUS LUKA BERBASIS POLYMERASE CHAIN REACTION DENGAN TARGET GEN PENGKODE FLAGELIN fliC

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11

PAGE 12

PAGE 13