

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Staphylococcus aureus

Bakteri merupakan bagian dari mikroorganisme prokariotik bersel satu yang hidup berkoloni, tidak memiliki selubung inti, mampu hidup dimana saja, dan pada kondisi lingkungan yang berbeda dengan cara beradaptasi terhadap lingkungan biotik dan abiotiknya. Bakteri memiliki beragam bentuk dan ukuran. Sel yang berbentuk bulat menyerupai bola disebut kokus, sedangkan sel yang berbentuk silinder disebut batang atau basil. Selain itu, terdapat beberapa sel batang yang membentuk bentuk spiral dan disebut spirilla (Nadjamuddin dkk., 2023).

Terdapat 2 jenis bakteri, terdiri atas bakteri gram positif dan gram negatif. Beberapa bakteri gram positif dan bakteri gram negatif tergolong flora normal yang terdapat pada tubuh manusia. Flora normal merupakan mikroorganisme yang tidak menyebabkan penyakit pada inang yang ditempati. Terdapat sekitar 10^2 – 10^6 CFU/cm² bakteri pada kulit normal. Namun, terdapat sebagian dari bakteri gram positif dan gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit (*pathogen*) jika jumlahnya mencapai 1.000.000 atau 10^6 per Gram yang cukup untuk memproduksi toksin, salah satunya ialah *Staphylococcus aureus* (Holderman, De Queljoe dan Rondonuwu, 2017).

1. Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut (Soedarto, 2015):

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*

Phylum : *Firmicutes*
Class : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Species : *Staphylococcus aureus*

2. Morfologi bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang memiliki bentuk bulat seperti bola (kokus) dengan garis tengah $\pm 1 \mu\text{m}$. Bakteri ini dapat berkelompok tidak teratur seperti buah anggur, tersusun empat-empat (tetrad), membentuk rantai (3 – 4 sel), berpasangan, atau satu-satu (Dewi, 2013). *Staphylococcus aureus* secara meluas tersebar di alam dan merupakan flora normal yang terdapat pada manusia, umumnya berada pada aksila, daerah inguinal dan perineal, serta lubang hidung (nares) bagian anterior. Sedangkan, sekitar 25% hingga 30% manusia memiliki bakteri ini pada rongga hidung dan kulitnya (Soedarto, 2015).

3. Sifat fisiologi bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus tidak aktif bergerak (*nonmotil*), tidak membentuk spora (*nonspora*), bersifat anaerob fakultatif, katalase positif, koagulase positif, dan oksidase negatif. Bakteri ini mampu menghadapi suhu panas hingga 50°C , memiliki kadar garam yang tinggi, dan tahan kekeringan. Bakteri ini juga mampu memfermentasi glukosa, terutama menghasilkan asam laktat. Berbeda dari spesies *Staphylococcus* lainnya, misalnya *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasi mannitol (Soedarto, 2015).

4. Patogenitas bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus menimbulkan infeksi pada manusia melalui invasi jaringan dan atau pengaruh toksin yang diproduksi. Infeksi berawal dari kolonisasi bakteri pada tubuh dan dapat menyebar melalui tangan ke bagian tubuh yang rentan, seperti luka pada kulit, lokasi pembedahan, tempat masuk kateter vaskular, atau area lain yang memiliki pertahanan tubuh yang lemah, seperti luka lecet atau eksim. *Staphylococcus aureus* dapat membentuk abses pada infeksi kulit. Bakteri ini kemudian dapat menyebar melalui aliran darah. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, infeksi pada tulang dan sendi, serta endokarditis karena memiliki enzim proteolitik. Pada individu yang memiliki gangguan sistem kekebalan tubuh (seperti pasien kanker yang mengalami neutropenia), infeksi yang terjadi akibat terapi intravena dapat menimbulkan komplikasi serius, seperti sepsis fatal akibat bakteremia *Staphylococcus aureus*. Pada pasien dengan fibrosis kistik, infeksi *Staphylococcus aureus* yang menetap dapat mengarah pada resistensi terhadap antibiotik (Soedarto, 2015).

B. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

1. Definisi bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus termasuk salah satu bakteri yang cenderung mengembangkan resistensi terhadap antibiotik. Salah satu strain yang terkenal adalah *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), yang kini menjadi masalah utama di berbagai negara, baik yang maju maupun berkembang (Kurniawan, Tyas, dan Supriyadi, 2021). MRSA adalah varian *Staphylococcus aureus* yang mengalami perubahan genetik dan dikenal sebagai *superbug* karena kemampuannya untuk menghindari efek beberapa antibiotik golongan β -laktam,

misalnya *penisilin*, *methicillin*, *ampicillin*, *amoxicillin*, *nafcillin*, *carbenicillin*, *oxacillin*, *sefalosporin*, *karbapenem*, dan *monobaktam*. Terdapat tiga jenis MRSA, yaitu *Healthcare Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (HA-MRSA), (*Community Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), dan *Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) (Pristianingrum dkk., 2021).

2. Morfologi bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

Secara mikroskopik, MRSA memiliki ciri-ciri yang sama dengan *Staphylococcus aureus*, baik dari segi biokimia maupun koloni, yakni bakteri gram positif yang memiliki bentuk bulat seperti bola (kokus) dengan garis tengah $\pm 1 \mu\text{m}$ yang dapat berkelompok tidak teratur seperti buah anggur, tersusun empat-empat (tetrad), membentuk rantai (3 – 4 sel), berpasangan, atau satu-satu (Dewi, 2013). Namun, perbedaannya terletak pada kekebalannya terhadap beberapa jenis antibiotik dan kecenderungannya untuk tumbuh lebih lambat pada media (Pristianingrum dkk., 2021).

3. Mekanisme resistensi bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

Pada awalnya, MRSA merupakan penyebab utama infeksi nosokomial di rumah sakit. Namun seiring berjalannya waktu, MRSA menyebar ke lingkungan komunitas yang membuatnya semakin sulit untuk dikendalikan karena adanya gen yang resisten terhadap antibiotik golongan β -laktam (Kurniawan, Tyas dan Supriyadi, 2021). Resistensi antibiotik muncul akibat penggunaan antibiotik yang tidak sesuai, di mana bakteri menghasilkan enzim yang dapat menghambat efektivitas kerja antibiotik, sehingga antibiotik menjadi tidak efektif (Fitria, Widiyasi dan Airlangga, 2021).

Pada bakteri *Staphylococcus aureus* yang berkembang menjadi MRSA, resistensi terhadap antibiotik terjadi karena ekspresi protein *Penicillin Binding Protein 2a* (PBP2a) yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam. Afinitas rendah ini membuat PBP2a tidak dapat berikatan dengan antibiotik tersebut, sehingga sintesis peptidoglikan tetap berjalan. Ekspresi PBP2a disebabkan oleh elemen genetik *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) yang membawa gen *mecA*, yang mengkode PBP2a (Kemalaputri dkk., 2017). SCCmec juga mengandung gen *cytolisin psm-mec* yang dapat memicu virulensi pada strain HA-MRSA, serta gen *ccrA* dan *ccrB* yang mengatur rekombinasi elemen SCCmec dalam kromosom *S. aureus*. Penelitian genetika menunjukkan bahwa mekanisme resistensi MRSA terhadap antimikrobia β -laktam melibatkan operon *mecA*, yang memiliki struktur, fungsi, dan mekanisme serupa dengan operon *blaZ* pada plasmid *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan enzim betalaktamase (Pristianingrum dkk., 2021).

C. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Identifikasi MRSA dapat dilakukan dengan metode konvensional, yaitu kultur bakteri pada media agar. Namun, metode ini memiliki alur pemeriksaan yang panjang. Dengan alur pemeriksaan yang panjang tentunya waktu yang dibutuhkan cukup lama serta membutuhkan sumber daya yang lebih banyak dan terampil, sehingga kurang efisien untuk diterapkan. Oleh karena itu, metode molekuler digunakan sebagai alternatif agar mendapatkan hasil pemeriksaan yang spesifik dalam kurun waktu yang singkat. Salah satu pemeriksaan berbasis molekuler adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini dikenal memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Artdita dkk., 2021). Pemeriksaan ini dilakukan

dengan mengamplifikasi gen spesifik yang telah diketahui, yang dapat diakses pada *Gene Bank* di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Metode PCR menawarkan alternatif untuk identifikasi bakteri dengan cara yang lebih cepat. Dengan menggunakan PCR, identifikasi bakteri *pathogen* dapat dilaksanakan dalam waktu kurang dari 24 jam, jauh lebih cepat dibandingkan dengan metode konvensional. PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri *pathogen* dengan sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi (Aziz dkk., 2020).

1. Definisi

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang pertama kali diperkenalkan oleh Karry Mullis (1985). Teknik ini memungkinkan amplifikasi segmen DNA hingga jutaan kali dalam waktu hanya beberapa jam. Penemuan PCR, bersama dengan teknik lainnya seperti sekuensing DNA, telah mengubah secara signifikan berbagai bidang ilmu dan teknologi, terutama dalam diagnosis penyakit genetik, kedokteran forensik, dan studi evolusi molekuler (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Komponen utama dalam proses PCR meliputi *template* DNA; pasangan primer, (oligonukleotida pendek yang memiliki urutan komplementer dengan *template* DNA); *buffer* PCR; dNTPs; Magnesium klorida ($MgCl_2$); dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Agar memperoleh hasil PCR yang optimal, perlu dilakukan optimasi pada proses PCR. Optimasi ini erat kaitannya dengan berbagai faktor, seperti jenis polimerase DNA, durasi waktu, suhu, *buffer* PCR, konsentrasi dNTPs, $MgCl_2$, serta DNA polimerase (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Suhu *annealing* primer,

konsentrasi dan kualitas DNA, enzim polimerase, konsentrasi $MgCl_2$, kualitas dan konsentrasi primer, jumlah siklus PCR, serta faktor lain seperti larutan *buffer* sangat penting dan memengaruhi keberhasilan proses PCR (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

2. Prinsip umum

PCR merupakan suatu teknik yang melibatkan serangkaian siklus berulang, di mana setiap siklus akan menggandakan jumlah DNA target untai ganda. Proses dimulai dengan pemisahan untai ganda DNA *template* (DNA yang belum diperbanyak) melalui denaturasi termal, lalu pendinginan dilakukan hingga mencapai suhu tertentu agar primer dapat berikatan atau menempel (*anneal*) pada lokasi spesifik di DNA target. Enzim polimerase DNA kemudian akan menambah panjang primer (*extend primers*) dengan bantuan dNTPs yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP serta *buffer* yang sesuai. Proses ini biasanya dilakukan dalam 20 hingga 40 siklus. Setelah siklus keempat, jumlah DNA target yang diinginkan (produk target pendek) akan meningkat secara eksponensial, sementara DNA non-target (produk panjang) akan meningkat secara linier. Pada umumnya, proses PCR menggunakan sekitar 30 siklus. Penggunaan lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah *amplicon* secara signifikan, sebaliknya malah meningkatkan produk non-target. Namun, penting untuk diingat bahwa efisiensi amplifikasi dalam PCR tidak mencapai 100% karena adanya kelebihan *template* target, keterbatasan jumlah polimerase DNA, serta terdapat kemungkinan terjadi *reannealing* pada untai target (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. Tahapan dalam PCR

Dalam proses PCR mencakup beberapa tahapan, yaitu:

- a. *Pre-denaturation* (pra-denaturasi DNA *template*).
- b. *Denaturation* (denaturasi atau pemisahan rantai *double helix* DNA *template*).
- c. *Annealing* (penempelan primer pada *template*).
- d. *Extension* (pemanjangan primer).
- e. *Post-extension* (pemantapan).

D. Desain Primer

Keberhasilan proses PCR sangat dipengaruhi oleh primer yang digunakan. Dalam PCR, primer berperan untuk menentukan batas *fragmen* DNA target yang akan diperbanyak serta menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3', yang dibutuhkan untuk memperpanjang rantai DNA. Primer dirancang berdasarkan urutan DNA yang sudah diketahui atau urutan protein yang ingin diteliti yang dapat diambil dari database seperti *Gene Bank*. Apabila urutan DNA atau protein yang dimaksud belum diketahui, perancangan primer dilakukan dengan menganalisis homologi dengan urutan DNA atau protein yang sudah dikenal dan memiliki keterkaitan kekerabatan yang paling dekat (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Dalam merancang primer, ada beberapa kriteria yang harus dipenuhi, sebagai berikut:

1. Panjang primer

Panjang primer yang dipilih saat merancang primer harus diperhatikan dengan seksama. Umumnya, panjang primer berada dalam rentang 18 hingga 30 basa. Panjang primer yang kurang dari 18 basa dapat menurunkan spesifisitasnya. Apabila primer terlalu pendek maka lebih rentan terhadap *mispriming* yaitu penempelan primer pada lokasi yang tidak diinginkan, di mana hal tersebut dapat

menurunkan spesifisitas primer dan mempengaruhi efektivitas serta efisiensi PCR. Sedangkan, panjang primer melebihi 30 basa tidak memberikan peningkatan spesifisitas yang signifikan dan justru dapat meningkatkan biaya (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2. Komposisi primer

Dalam proses perancangan primer, salah satu hal yang penting diperhatikan adalah komposisi primer. Pengulangan nukleotida yang serupa sebaiknya dihindari karena dapat mengurangi spesifisitas primer dan meningkatkan kemungkinan terjadinya mispriming pada lokasi yang tidak diinginkan. Kandungan (G+C) pada primer sebaiknya sama atau lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan (G+C) pada DNA target. Primer dengan kandungan (G+C) rendah cenderung kurang efektif dalam berikatan dengan lokasi target, yang dapat mengurangi efisiensi PCR. Selain itu, urutan nukleotida di ujung 3' sebaiknya mengandung G atau C. Nukleotida A atau T memiliki kemungkinan yang lebih tinggi dalam menyebabkan mismatch dibandingkan nukleotida G atau C, sehingga dapat menurunkan spesifisitas primer (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. *Melting temperature* (T_m)

Merupakan suhu di mana sebanyak 50% untai ganda DNA terpisah. T_m primer memengaruhi penentuan suhu annealing dalam proses PCR, sehingga pemilihan T_m sangat penting dan patut dicermati. T_m primer berkaitan dengan panjang primer dan komposisi primer itu sendiri. Nilai T_m dapat dihitung dengan rumus $[2(A+T) + 4(C+G)]$. Disarankan agar T_m primer berada dalam rentang 50°C hingga 65°C (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

4. Interaksi primer

Hindari interaksi primer seperti *self-homology*, *cross-homology*, serta terjadinya *mispriming* pada daerah yang tidak diinginkan. Hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer dan menyebabkan pengurangan konsentrasi primer yang pada akhirnya akan memengaruhi efisiensi proses PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001).