DETEKSI MOLEKULER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SEBAGAI PENYEBAB MASTITIS PADA PAYUDARA

Oleh:

I Gst. Ag. Ayu Hari Triandini
Dosen Akademi Kebidanan Bhakti Kencana Mataram

Abstrak

Infeksi payudara mastitis merupakan peradangan pada payudara. Penyebab infeksi tersebut umumnya adalah *Staphylococcus aureus*. Mastitis diakibatkan oleh sumbatan saluran susu yang berlanjut. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dasar-dasar teknik deteksi molekuler bakteri penyebab infeksi khususnya *S. aureus* guna menegakkan diagnosis. Teknik-teknik deteksi molekuler yang umum dilakukan yaitu analisis DNA genom, analisis DNA plasmid dan analisis protein. Ketiganya bermanfaat dalam identifikasi molekuler mikrobia serta rekayasa genetika mikrobia.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, mastitis, deteksi, molekuler

PENDAHULUAN

Mastitis adalah suatu rasa sakit yang terjadi pada payudara yang ditandai dengan gejala payudara tampak merah, panas dan sakit (meradang). Mastitis berbeda dengan saluran tersumbat, karena saluran tersumbat bukanlah infeksi, sehingga tidak perlu diobati dengan antibiotik. Bakteri penyebab infeksi mastitis adalah *S. aureus*. *Staphylococcus aureus* selain menimbulkan mastitis juga mampu menimbulkan berbagai macam kasus penyakit pada manusia antara lain infeksi kulit, keracunan makanan, endokarditis, pneumonia, osteomielitis, sepsis artritis dan encephalitis (Tsen *et al*., 2002). Deteksi molekuler umumnya diperlukan untuk identifikasi mikrobia misalnya membedakan strain MRSA dan strain *S. aureus* yang lain sehingga dapat diaplikasikan pada penanganan selanjutnya. Di Indonesia, masih menggunakan deteksi konvensional untuk mendiagnosis suatu penyakit infeksi. Metode-metode dasar yang dilakukan dalam deteksi molekular penting diketahui agar dapat mengefektifkan pemeriksaan.

METODE

a. Kultur *S. aureus*

Staphylococcus aureus dikultur dalam medium BHI, digojog pada suhu 37˚C semalaman.

b. Analisis DNA Genom

1. Isolasi DNA Genom

15 mL kultur *S. aureus* disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang, pellet ditambahkan 750 µL buffer lysis, divortex dan ditambahkan Proteinase K 20 µL (10 mg/mL) kemudian digojog kuat selama 30 menit dengan shaker (420 rpm). Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 55˚C selama 30 menit dalam waterbath dan selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Fenol 500 µL ditambahkan ke dalam campuran dan digojog 15 menit. Campuran kemudian disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit disertai etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 sampai 1:2 hingga terbentuk benang-benang DNA. Benang-benang DNA diambil, dicuci dengan etanol 70% kemudian disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang. DNA dikeringanginkan. Buffer TE 250 µL dimasukkan ke dalam campuran atau disesuaikan dengan banyaknya DNA. DNA siap dielektroforesis.

2. Analisis Kuantitatif dan Kualitatif DNA Genom

Analisis kualitatif DNA menggunakan elektroforesis sedangkan analisis kuantitatif DNA menggunakan spektrofotometer pada λ = 260 nm dan λ= 280 nm

Konsentrasi DNA = OD 260 x konstanta (50) x faktor pengenceran

Kemurnian = OD 260/ OD 280, jika kurang dari 1,8 maka kontaminasi protein, jika lebih dari 1,8 maka kontaminasi RNA.

3. Amplifikasi DNA Genom dengan PCR

Amplifikasi DNA menggunakan *bead ready to go*. Dengan menggunakan primer Box A1R (5 pmol/µL).

Program PCR:

94˚C 4 menit
92˚C 1 menit } denaturasi
50˚C 1 jam 30 menit (*annealing*)
68˚C 8 menit
12˚C 10 menit } ekstensi

Sebanyak 30 siklus

Running di gel agarose 2%, 100 V 30 menit

4. Elektroforesis dengan Gel Polyacrylamid

Gel yang disiapkan ada dua macam yaitu *gradient gel*/*separating gel* 10% SDS PAGE dan *stacking gel* 5% SDS PAGE. Bahan *gradient gel* dicampur, kemudian dituang secara cepat ke cetakan. Setelah dingin/mengeras, bahan *stacking gel* yang telah dicampur dimasukkan ke dalam cetakan bagian atas, untuk menghilangkan gelembung ditambahkan larutan butanol. Sisir dipasang dan dilepas kembali setelah *stacking gel* membeku, untuk menghilangkan larutan butanol, dicuci dengan aquades. Sumuran siap di-*loading* dengan larutan sampel yang akan di-*running*. Sementara itu, 8 µl sampel dan 2 µl buffer 5x dimasukkan dalam ependorf, dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit dan selanjutnya sampel siap di-*running* dalam SDS PAGE. Proses *running* dilakukan selama 1,5 sampai 2 jam atau sampai larutan sampel dalam sumuran yang berwarna biru berada di bagian batas bawah gel polyacrylamid atau bagian kutub positif dengan tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis kemudian diberi perlakuan *silver staining*:

c. Analisis DNA Plasmid

1. Isolasi DNA Plasmid

Diambil 1-2 koloni bakteri dari lempeng agar, dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi 5 mL LB medium dan antibiotik yang sesuai. Tabung digojog kuat-kuat dalam shaker inkubator 37˚C, semalaman dan disentrifuge 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet disuspensikan dengan 100 µL *lysate solution* I. (diamkan dalam es selama 5 menit). Ditambahkan 200 µL *lysing solution* II (baru), kemudian dicampurkan dengan membolak-balikkan tabung (diamkan dalam es selama 5 menit). 150 µL *lysing solution* III, ditambahkan ke dalam campuran dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan pellet dibuang. Ditambahkan phenol CIAA sama banyak dengan volume supernatan. Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit. Ditambahkan 1/10 volume 3 M Na asetat dan 1:1 etanol absolut dingin homogenisasi dan diamkan dalam -20˚C selama 10 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pellet dicuci dengan etanol 70%, diinkubasi 1 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan. Ditambahkan TE 50µL. DNA siap dielektroforesis.

2. Transformasi Plasmid dengan TSS

Bakteri disentrifugasi 2500 rpm selama 10 menit pada suhu 4˚C. Cairan dibuang, pada pellet ditambahkan 1 mL 2x TSS (disuspensikan). 100 µL kultur bakteri diambil tambahkan DNA plasmid (pUC) 2-3µL dicampur dan diinkubasikan ke dalam es/ suhu 4˚C selama 45 menit *heat shock* 42˚C selama 90 detik. Ditambahkan 500 µL TSS 1x dan pastikan TSS dingin dan diinkubasi pada suhu 37˚C selama 1 jam dan diinokulasi 100 µL, 50 µL dan 25 µL pada media seleksi (LB medium+antibiotic). Diinkubasi semalam pada suhu 37˚C.

d. Analisis Protein

1. Isolasi Protein:

Supernatan *S. aureus* ditambahkan 9 mL buffer PBS dan diresuspensi. Sentrifugasi pellet dan supernatant pada kecepatan 3000 rpm dengan suhu 4˚C selama 15 menit. Pelet kemudian ditambahkan 1 mL buffer PBS dan diresuspensi. Supernatan ditambahkan 9 mL buffer PBS dan diresuspensi lagi. Sentrifugasi pellet dan supernatan pada kecepatan 3000 rpm dengan suhu 4˚C selama 15 menit. Pelet kemudian ditambahkan 0,5 mL buffer PBS dan diresuspensi. Sonikasi 6x selama masing-masing 30 detik. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit (pellet dibuang). Supernatan (protein intraseluler) disimpan pada suhu -20˚C.

2. Membuat Kurva Standar BSA (*bovine serum albumin*)

Dalam penentuan kadar protein suatu sampel, diperlukan suatu kurva standar kadar protein. Kurva ini diperoleh dengan terlebih dahulu menyiapkan larutan standar protein berupa *bovine serum albumin* (BSA) dari stok yang berkadar 1 mg/mL.

No.	dH_2O (µL)	BSA (1 mg/mL) (µL)	Bradford Assay (µL)
1.	800	-	200
2.	799	1	200
3.	798	2	200
4.	796	4	200
5.	792	8	200
6.	784	16	200
7.	768	32	200

Running SDS PAGE dibutuhkan 15 µL protein per sumuran. Dari 100 µL protein diambil 25 µL dan diberi sample buffer 5x, direbus selama 2 menit dan dimasukkan dalam es.

Pengukuran Konsentrasi Protein:

Blanko = 800 µL dH_2O +200 µL Bradford Protein Assay = 1000 µL

Sampel = 798 µL dH_2O + 2 µL protein + 200 µL Bradford = 1000 µL

Dibaca pada spektrofotometer UV vis dengan panjang gelombang 595 nm.

3. Elektroforesis Protein dengan SDS Page

Sampel buffer ditambahkan ke dalam sampel protein (perbandingan 1:1) dalam tabung Eppendorf. Sampel dipanaskan pada suhu 100˚C selama 5 menit. Setelah dingin, sampel disimpan pada suhu 20˚C bila sampel tidak langsung dipakai. *Separating gel* 10% dan *stacking gel* 5% disiapkan dan sampel dimasukkan pada sumur gel kemudian *running* sampel.

4. Pewarnaan gel dengan Comassie Briliant Blue (CBB)

Untuk tahap ini diperlukan larutan *staining* untuk mewarnai protein pada gel dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel hasil elektroforesis direndam secara bergiliran pada larutan *staining* dan *destaining*.

5. Pewarnaan Silver

Gel dilepas, tambahkan 40 mL asam asetat 10% dan di*shaker* selama 1 jam pada suhu kamar atau pada suhu 4˚C semalaman. Asam asetat dibuang, gel dicuci dengan H_2O, 3 x 2 menit atau 3 x 5 menit (penyimpanan 4˚C). Tambahkan larutan *staining* ($AgNO_3$ 0,15% dan formaldehyde 0,056%), di*shaker* selama 45 menit pada suhu kamar dalam kondisi gelap. Larutan *staining* dibuang, gel dicuci H_2O selama 15 detik dan dimasukkan larutan *developing* (3% Na_2HCO_3, 0,056% formaldehyde, 0,0002% sodium thiosulfate) kemudian di*shaker*/ goyang pada suhu kamar. Setelah *band* tampak jelas, ganti larutan *developing*. Pewarnaan dihentikan dengan 10% asam asetat.

HASIL

a. Analisis DNA Genom dan Plasmid

Prinsip isolasi DNA adalah memisahkan DNA dari kandungan biomolekul lainnya serta menjaga keutuhan struktur primernya. Secara umum, prosedur dasar isolasi DNA terdiri dari: perusakan sel (lisis sel) serta ekstraksi, presipitasi dan pelarutan DNA. Analisis kuantitatif DNA dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang didapatkan. Hasil spektrofotometri menunjukkan data sebagai berikut:

OD 260 = 0,3041

OD 280 = 0,1616

Ratio OD = 1,8821

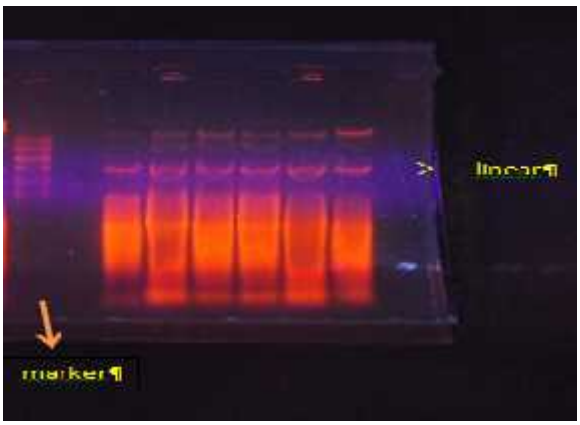
Konsentrasi DNA genom yang diperoleh = 0,3041 x 50 x 100 = 1520,5 µg/mL

Tingkat kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio konsentrasi aliquot DNA pada absorbansi 260 nm dibandingkan dengan konsentrasi aliquot DNA pada absorbansi 280 nm. Jika rasio kurang dari 1,8 menunjukkan adanya pengotor protein atau fenol, sedangkan lebih dari 1,8 menunjukkan adanya RNA. Uji kualitatif dengan gel agarose dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan DNA dan juga mengukur kualitas kemurnian isolasi DNA.

Gambar 1. Hasil Isolasi DNA Genom

Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA Genom *S. aureus*

Sesuai hasil yang diperoleh pada gambar 2, diperoleh bahwa DNA yang dihasilkan masih murni karena ratio OD = 1,8821 dan tidak adanya *smear* pada *band* elektroforesis. Hasil isolasi DNA plasmid yang didapat seperti tertera pada gambar 3 yaitu menunjukkan bentuk DNA plasmid linear. Dalam penelitian ini digunakan *bead PCR ready to go* yaitu merupakan reagen *pre-mixed, pre-dispensed PCR* yang dikemas dalam bentuk *bead* (bola pejal). Dalam *bead* mengandung *stabilizer*, deoxynucleotides, 1-1.5 unit Taq polymerase dan buffer (50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ dan 10 mM Tris-HCl pH 9.0 pada suhu kamar). Bahan tambahan yang perlu disediakan adalah template, primer dan dH_2O.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA Plasmid *S. aureus*

Siklus PCR secara umum terdiri dari (Yuwono, 2006):

1) Denaturasi yaitu untai ganda DNA terpisah menjadi masing-masing untai tunggal.
2) Annealing yaitu terjadi pengenalan/penempelan primer cetakan DNA, Suhu *annealing* disesuaikan dengan template DNA. Umumnya lebih kecil 5˚C dari Tm.
3) Ekstensi yaitu terjadi proses polimeriasasi untuk pembentukan untai DNA baru. Waktu untuk ekstensi tergantung ukuran DNA yang digandakan.

Dengan diperoleh hasil PCR maka dapat dilanjutkan dengan analisis molekuler lainnya seperti kloning, sekuensing, deteksi mutasi dan kajian forensik.

b. Analisis Protein

Purifikasi dan analisis protein berguna untuk mendesain probe oligonukleotida untuk cloning, mengkonfirmasi sekuen DNA, mensintesis peptide untuk mendapatkan antipeptide-antibodi. Protein yang diisolasi adalah protein intrasel, jadi bagian yang lebih banyak dianalisis adalah supernatan. Sonikasi merupakan metode homogenisasi dengan menggunakan gelombang yang bertujuan untuk menghancurkan membran sel untuk mengambil kandungan sitoplasma dan organelnya. Metode ekstraksi *sonikasi* memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 42 kHz yang dapat mempercepat waktu kontak antara sampel dan pelarut pada suhu ruang. Sonikasi mengandalkan energi gelombang yang menyebabkan proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel bakteri (Ashley *et al.*, 2001). Sonikasi dilakukan pada suhu rendah agar protein tidak mudah rusak bila di luar kondisi fisiologisnya. homogenisasi dengan sonikasi akan menghasilkan homogenate yang berupa larutan keruh yang terdiri atas debris sel (bagian yang tidak hancur), organel-organel sel dan makromolekul penyusun sel yang diantaranya adalah protein. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan debris dan organel sel yang mengendap di dasar tabung (pellet) dan supernatan yang berupa protein dengan ukuran lebih kecil daripada debris dan organel yang kemudian mengendap tapi terlarut dengan buffer. Homogenat masih mengandung *crude protein*.

Tabel 1. Hubungan Volume Protein BSA dengan Nilai Absorbansi pada 595 nm

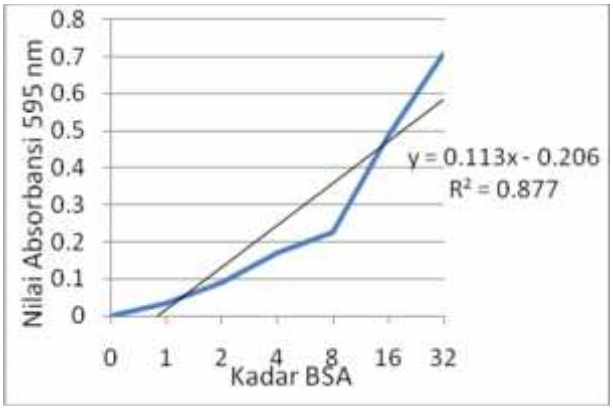
Nilai Absorbansi pada λ=595 nm	Kadar BSA (µg/2µL)
0	0
0.036	1
0.092	2
0.17	4
0.226	8
0.486	16
0.71	32

Sumber: Data primer, 2015

Nilai kadar BSA (nilai X) dicari dengan memasukkan nilai y (nilai absorbansi pada panjang gelombang 595 nm):

Y= 0,113x-0,2063

$X= \frac{Y+0,2063}{0,113} = \frac{0,373+0,2063}{0,113} =$ 5.126 µg dalam 2 µL. Sehingga konsentrasi BSA yang didapat adalah 2.563 µg/µL.

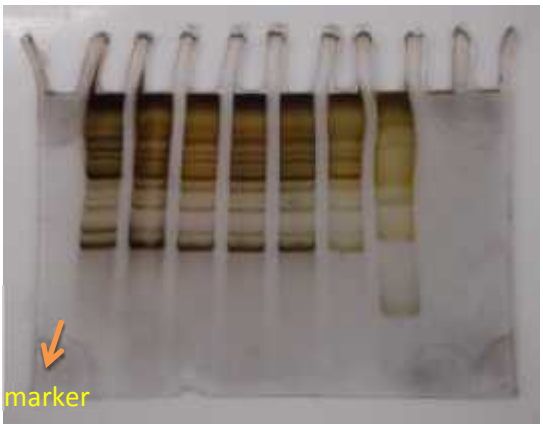


Gambar 4. Kurva Standar Kadar Protein BSA

Reagen Bradford dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam sebuah larutan. Melalui kurva yang didapat, didapatkan nilai regresi 0,8776. Berarti data hubungan antara kadar BSA dengan nilai absorbansi dapat dipolakan dengan model regresi linear (persamaan garis lurus).

Semakin tinggi kadar BSA maka semakin tinggi nilai absorbansi. Bradford assay bersifat lebih cepat, memerlukan langkah-langkah pencampuran yang tidak terlalu banyak, tidak memerlukan pemanasan serta memberikan respon kolorimetrik yang lebih stabil dibandingkan assay protein lainnya. Kelemahan metode Bradford assay adalah membutuhkan pengenceran sebelum analisis, dihambat oleh keberadaan detergen (Anonim, 2004). Metode ini berfungsi untuk mendeteksi protein, meningkatkan sensitivitas kisaran microgram yang biasanya digunakan dalam pewarnaan coomassie blue menjadi ke level yang lebih tinggi yaitu ke tingkatan nanogram. Untuk melihat pita komponen yang terbentuk, gel perlu diwarnai dengan pewarna khusus. Beberapa pewarna yang dapat digunakan dalam SDS-PAGE adalah *Commasie Brilliat Blue* dan *Silver Salt Staining*. *Commasie Brilliant Blue* mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen.

Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gel dengan CBB



Gambar 6. Hasil Pewarnaan Gel dengan *Silver Staining*

Metode *silver staining* dikembangkan untuk menutupi kekurangan pewarnaan dengan coomassie blue dari segi pembiayaan, kualitas latar belakang. *Commasie Brilliant Blue* mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen. *Silver Salt Staining* memiliki sifat lebih sensitif dan akurat namun membutuhkan proses yang lebih lama.

PENUTUP

Teknik-teknik deteksi molekuler yang umum dilakukan yaitu analisis DNA genom, analisis DNA plasmid dan analisis protein. Ketiganya bermanfaat dalam identifikasi molekuler mikrobia serta rekayasa genetika mikrobia.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim.2004.http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html

Ashley, K., Andrews R.N, Cavazosa L., Demange M. 2001. Ultrasonic Extraction as A Sample Preparation Technique For Elemental Analysis By Atomic Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16:1147-1153.

Tsen, S.D. Fang, S.S. Chen, M.J. Chien, J.Y. Lee, C.C. and Tsen, D.H. 2002. Natural Plasmid Transformation in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Science*, vol. 9, no. 3, p. 246-252.

Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Andi. Yogyakarta.