

LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING



IDENTIFIKASI
GEN ENTEROTOKSIN DAN EXOFOLIATIF
ISOLAT *Staphylococcus aureus* ASAL SUSU SAPI PERAH DAN SUSU
KAMBING BOGOR

Drs. Budi Prasetyo, M.Si NIDN 28125907
Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si NIDN 5117008

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
2013

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Identifikasi Gen Enterotoksin dan Exofoliatif Isolat
Staphylococcus aureus Asal Susu Sapi Perah dan Susu
Kambing Bogor

Peneliti/Pelaksana:

a. Nama Lengkap : Drs. Budi Prasetyo, M.Si
b. NIDN : 28125907
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Biologi
e. Nomor HP : 08129830950
f. Alamat surel (e-mail) : budi-p@ut.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si
b. NIDN : 5117008
c. Perguruan Tinggi : Universitas Terbuka

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 (satu) dari rencana 2 (dua) tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 40.000.000,-
Biaya Keseluruhan : Rp. 123.670.000,-

Tangerang Selatan, Oktober 2013

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian/Pengabdian

Ketua Peneliti,

(Dra. Dewi Artati Padmo Putri, M.A, Ph.D)
NIP. 196107241987102001

(Drs. Budi Prasetyo, M.Si)
NIP. 195912281991031003

RINGKASAN

Sebagian besar kasus keracunan makanan yang berasal dari bakteri disebabkan oleh konsumsi makanan yang mengandung *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* termasuk bakteri berbahaya, karena mampu memproduksi racun yang disebut enterotoksin, racun tersebut memiliki masa inkubasi satu hingga delapan jam. Gejala yang ditimbulkan akibat keracunan tersebut di antaranya sakit perut, muntah, dan diare. *S. aureus* mudah ditemukan di lingkungan hidup kita seperti udara, kotoran, air, susu, dan makanan lainnya. Beberapa kasus keracunan di Indonesia yang disebabkan oleh konsumsi minuman susu tercatat sebagai berikut. Pada bulan September 2004 telah terjadi keracunan susu pada 72 siswa Sekolah Dasar (SD) di Tulung Agung Jawa Timur. Kasus yang sama juga menimpa pada 300 siswa di salah satu SD di kota Bandung, begitu pula di Surabaya Jawa Timur keracunan susu terjadi pada 73 orang karyawan Supermarket Carefour. Pada tanggal 2 Juni 2009, 10 siswa SD di Cipayang Jakarta Timur dan 293 siswa SD di Kecamatan Sindangkarta, Kabupaten Bandung mengalami keracunan setelah mengkonsumsi minuman susu. Hasil analisis Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) keracunan tersebut disebabkan oleh *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Keutamaan penelitian adalah seringkali telah dilakukan penelitian biologi molekuler yang berkaitan dengan *Staphylococcus aureus* sebagai isolat menggunakan gen 16S rRNA, tetapi pada penelitian kali ini digunakan gen 23S rRNA. Salah satu keunggulan penggunaan 23S rRNA adalah mengandung sekuen lebih panjang, sisipan dan atau penghapusan yang unik, dan diprediksi memiliki resolusi filogenetik lebih baik karena variasi urutannya lebih tinggi (Ludwig & Schleifer, 1994). Di samping itu, gen 23S rRNA juga mengandung *conserved region* untuk mendesain primer dengan derajat kesamaan hampir sama dengan primer untuk gen 16S rRNA (Hunt *et al*, 2006).

Penelitian ini bertujuan mendeteksi gen enterotoksin dan exfoliatif asal isolat *S. aureus* susu sapi perah dan susu kambing yang berasal dari Desa Cijeruk, Bogor.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan prosedur kerja meliputi desain primer, preparasi DNA, amplifikasi gen 23S rRNA, amplifikasi gen penyandi enterotoksin dan exfoliatif, sekuensing DNA, dan analisis data.

Hasil penelitian menunjukkan berhasil dilakukan preparasi DNA *Staphylococcus aureus* ditandai dengan terbentuknya endapan DNA berupa serabut-serabut berwarna putih, konfirmasi isolat *S. aureus* melalui amplifikasi gen 23S rRNA menunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya *band* pada ukuran 2720 bp. Amplifikasi gen enterotoksin dan exfoliatif memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *sea*, *seb*, dan *eta* untuk 2 isolat (susu sapi perah dan susu kambing). Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA dengan panjang spesifik (121 bp) untuk *sea*, 477 bp untuk *seb*, 119 bp untuk *eta*. Hasil negatif (fragmen tidak muncul) terjadi pada amplifikasi gen *etb* baik untuk susu sapi perah maupun susu kambing.

Kesimpulan menggunakan metode PCR dapat dideteksi adanya gen *sea*, *seb*, dan *eta* pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan susu kambing dari Desa Cijeruk, Bogor.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan Penelitian Hibah Bersaing	ii
Ringkasan	iii
DAFTAR ISI	iv
I. BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	2
C. Luaran Penelitian	2
II. BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
A. Karakteristik <i>Staphylococcus aureus</i>	3
B. Enterotoksin	3
C. Toksin Exfoliatif	4
III. BAB III. METODE PENELITIAN	5
A. Tempat dan Waktu Penelitian	5
B. Bahan dan Alat	5
C. Prosedur Kerja	5
1. Desain Primer	5
2. Preparasi DNA	6
3. Amplifikasi Gen 23S rRNA Dengan PCR	6
4. Amplifikasi Gen Enterotoksin dan Exfoliatif	7
IV. BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	8
V. BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	13
VI. BAB VI. DAFTAR PUSTAKA	14

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sebagian besar kasus keracunan makanan yang berasal dari bakteri disebabkan oleh konsumsi makanan yang mengandung *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* mudah ditemukan di lingkungan hidup kita seperti udara, kotoran, air, susu, dan makanan lainnya. Bahkan pada hewan maupun manusia sendiri merupakan reservoir utama bagi pertumbuhan *S. aureus*. Pada manusia, bakteri ini merupakan patogen penting sebagai penyebab timbulnya berbagai kasus penyakit seperti keracunan makanan, infeksi kulit, endokarditis, pneumonia, osteomielitis, sepsis arthritis, dan ensefalitis (Tseng *et al.*, 2004). Di samping faktor lingkungan turut berkontribusi terhadap peningkatan kontaminasi bakteri tersebut, rendahnya tingkat sanitasi pekerja diduga pula sebagai pemicu masuknya *S. aureus* ke dalam rantai pangan sehingga terjadi keracunan.

Beberapa kasus keracunan yang disebabkan oleh konsumsi makanan maupun minuman susu tercatat sebagai berikut. Pada tahun 2007 telah terjadi keracunan makanan terhadap 36 orang akibat mengonsumsi makanan ringan (snack) di salah satu hotel di Padang Sumatera Barat. Berdasarkan hasil uji klinis laboratorium diketahui sampel makanan positif mengandung *S. aureus* (Gentina *et al.*, 2008). Pada tahun 2010, terjadi peristiwa keracunan makanan terhadap ratusan warga Desa Pasawahan Kecamatan Tarogong Kaler, Garut sehingga kasusnya termasuk kejadian luar biasa. Gejala yang ditimbulkannya antara lain perut mual, kepala pusing bahkan disertai muntah-muntah dan badan lemas. Keracunan tersebut diduga kuat disebabkan oleh tiga jenis bakteri, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Candida* sp, dan *Basillus* sp. Menurut Suwito (2010), bulan September 2004 telah terjadi keracunan susu pada 72 siswa Sekolah Dasar (SD) di Tulung Agung Jawa Timur. Kasus yang sama juga menimpa pada 300 siswa di salah satu SD di kota Bandung, begitu pula di Surabaya Jawa Timur keracunan susu terjadi pada 73 orang karyawan supermarket. Pada tanggal 2 Juni 2009, 10 siswa SD di Cipayung Jakarta Timur dan 293 siswa SD di Kecamatan Sindangkarta, Kabupaten Bandung mengalami keracunan setelah mengonsumsi minuman susu. Hasil analisis Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) keracunan tersebut disebabkan oleh *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* (Suwito, 2010).

Faktor virulensi *Staphylococcus aureus* terdiri dari antigen (capsule dan adhesins), enzim (coagulase, lipase, hyaluronidase, staphylokinase, dan nuclease), serta sebanyak 7 toksin yaitu α -toksin, β -toksin, δ -toksin, P-V Leukocidin, enterotoksin, exfoliatif toksin, dan *toxic shock syndrome toxin* (TSST). *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri berbahaya, karena mampu memproduksi racun yang disebut enterotoksin, racun tersebut memiliki masa

inkubasi satu hingga delapan jam. Gejala yang ditimbulkan akibat keracunan tersebut di antaranya sakit perut, muntah, dan diare (Kitamoto *et al.*, 2009). Keracunan yang disebabkan oleh *S. aureus* tergolong dalam kasus intoksikasi, yakni tertelannya enterotoksin yang dihasilkan *S. aureus* melalui makanan. Enterotoksin stafilokoki dapat menyebabkan keracunan pada dosis yang sangat rendah, yaitu 0,5 ng/ml (Balaban & Rasooly, 2000).

Infeksi yang berhubungan dengan beberapa kasus keracunan makanan oleh *S. aureus* cenderung disebabkan oleh toksin yang khas yaitu TSST, enterotoksin, dan exfoliatif toksin (Dinges, *et al.*, 2000). Hasil riset Kusumaningrum dan Prasetyo (2012), terdeteksi adanya gen penyandi TSST-1 pada isolat *S. aureus* asal susu kambing dan susu sapi perah dari Bogor. Diduga kuat bahwa TSST yang dihasilkan oleh *S. aureus* merupakan penyebab utama keracunan makanan, karena banyaknya kemiripan aktivitas biologi antara TSST-1 dengan *staphylococcal* enterotoksin (Waldvogel, 1995). Hal tersebut diperkuat oleh hasil penelitian Yarwood *et al.*, (2002) yang menyatakan bahwa, enterotoksin terlibat secara bersama dalam aktivitas biologi. Sebagai satu kesatuan untuk kelengkapan informasi keracunan makanan dan infeksi yang ditimbulkan *S. aureus* asal susu kambing dan susu sapi perah dari Bogor, dalam riset saat ini faktor virulensi yang diteliti adalah enterotoksin dan exfoliatif toksin.

Keutamaan penelitian adalah seringkali telah dilakukan penelitian biologi molekuler yang berkaitan dengan *Staphylococcus aureus* sebagai isolat menggunakan gen 16S rRNA, tetapi pada penelitian kali ini digunakan gen 23S rRNA. Salah satu keunggulan penggunaan 23S rRNA adalah mengandung sekuen lebih panjang, sisipan dan atau penghapusan yang unik, dan diprediksi memiliki resolusi filogenetik lebih baik karena variasi urutannya lebih tinggi (Ludwig & Schleifer, 1994). Di samping itu, gen 23S rRNA juga mengandung *conserved region* untuk mendesain primer dengan derajat kesamaan hampir sama dengan primer untuk gen 16S rRNA (Hunt *et al.*, 2006).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian untuk mendeteksi gen enterotoksin dan exfoliatif asal isolat *S. aureus* susu sapi perah dan susu kambing yang berasal dari Bogor (Desa Cijeruk) dengan metode PCR.

C. Luaran Penelitian

Luaran dari Penelitian Hibah Bersaing ini di samping publikasi ilmiah dalam jurnal terakreditasi nasional dan seminar.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Karakteristik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, berbentuk bulat (*coccus*), berdiameter 0,5-1,5 μm , bergerombol seperti buah anggur, non motil, tidak berspora, bersifat anaerob fakultatif, menghasilkan koagulase, membentuk pigmen kuning keemasan pada *nutrient agar* serta memfermentasi glukosa dengan *mannitol*. *Staphylococcus aureus* tahan terhadap lisozim, suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 35-37°C, dengan suhu minimum 6,7°C dan maksimum 45,5°C, bakteri tersebut dapat tumbuh pada pH optimum sekitar 7,0-7,5. Todar (2005), menyatakan bahwa *S. aureus* mempunyai ciri-ciri yang khas antara lain adanya sifat hemolitik pada media agar darah, oksidase negatif, tumbuh pada suhu 15-45°C dalam NaCl dengan konsentrasi hingga 15%. Karakteristik penting *Staphylococcus aureus* adalah pembentukan pigmen koloni yang umumnya berwarna kuning keemasan, dan betahemolisis positif pada *blood agar*. Kedua karakter tersebut juga dimiliki strain *Staphylococcus epidermidis*, tetapi terdapat karakter yang membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus epidermidis* yaitu kemampuannya memproduksi nuklease tahan panas (Ash, 2000).

B. Enterotoksin

S. aureus banyak menyebabkan variasi infeksi pada manusia maupun infeksi yang diperoleh dari rumah sakit (*nosokomial*). Enterotoksin merupakan salah satu faktor virulensi yang dihasilkan oleh galur *S. aureus* dan umumnya sebagai penyebab keracunan makanan. Toksin tersebut seringkali dikaitkan sebagai penyebab kasus *foodborne disease* di berbagai belahan dunia. *Staphylococcal enterotoksin* (SE) adalah kelompok protein globular, diproduksi oleh sel bakteri selama pertumbuhan, dengan bobot molekul 28.000-35.000 dalton. SE merupakan agen yang menyebabkan sindrom keracunan dalam makanan baik pada manusia maupun hewan (Dinges *et al.*, 2000 dan Omoe *et al.*, 2002). Sekitar 50% galur *S. aureus* memproduksi enterotoksin yang dapat menimbulkan keracunan pangan pada manusia (Omoe *et al.*, 2002). *S. aureus* menjadi perhatian khusus dalam pengendalian penyakit infeksius karena bakteri ini mempunyai faktor-faktor patogenitas yang berperan dalam mempertahankan diri terhadap sistem kekebalan tubuh hospes. Diketahui pula bahwa bakteri tersebut telah resisten terhadap beberapa macam antibiotika (Todar, 2005). Enterotoksin stabil terhadap panas, air, dan garam terlarut (Thomas *et al.*, 2007).

Berbagai riset berkaitan dengan peranan *S. aureus* sebagai patogen penting pada manusia telah banyak dilakukan dan sampai sekarang telah teridentifikasi 19 jenis enterotoksin *S. aureus*, yakni *Staphylococcal Enterotoxin A* (SEA), SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SET, dan SEU (Williams *et al.*, 2000; Akineden, *et al.*, 2001; Orwin, *et al.*, 2002; Yarwood *et al.*, 2002; Letertre *et al.*, 2003; Omoe *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2004). Kesembilan belas jenis SE (SEA hingga SEO) diidentifikasi berdasarkan antigenisitasnya dan dinamakan dengan huruf abjad secara berurutan berdasarkan waktu penemuannya. Enterotoksin F tidak ada sebab telah dialokasikan sebagai sebuah protein yang bukan enterotoksin, yaitu *toxic shock syndrome toxin* (TSST) (Gilmour & Harvey, 1990).

C. Toksin Exfoliatif

Toksin exfoliatif (toksin pengelupas) disebut juga toksin epidermolitik, merupakan faktor virulensi bagi *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* menghasilkan sejumlah besar penentu virulensi meliputi protease, enterotoksin, toksin sitolitik, protein A, *clumping factor* dan virulensi lainnya, yang diduga berperan penting dalam membentuk dan memelihara infeksi yang disebabkan oleh bakteri tersebut. Exfoliatif merupakan satu dari beberapa protein ekstraseluler, dikenal sebagai penyebab melepuhnya kulit atau *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) (Ladhani *et al.*, 1999). Beberapa strain *Staphylococcus aureus* mampu menghasilkan satu atau keduanya dari toksin exfoliatif ETA dan ETB. Kedua toksin exfoliatif tersebut secara serologis berbeda namun terdapat kemiripan terutama pada aktivitas biologi dan derajat kesamaan genetiknya. Toksin exfoliatif A (ETA) merupakan produk gen kromosomal sebaliknya ETB merupakan produk gen plasmid (Marrack & Kappler, 1990).

BAB III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di laboratorium terpadu Seameo Biotrop, Bogor selama 8 bulan dari bulan April sampai November 2013.

B. Bahan dan Alat

Bahan: - Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari susu sapi perah dan susu kambing dalam *glycerol* berasal dari Desa Cijeruk, Bogor
- Penanda DNA (DNA *marker*) dan Primer
- Media PAD/media plat agar darah
- Bahan kimia untuk preparasi DNA

Alat: - Sentrifus
- Vortex
- Peralatan gelas
- Tabung *ependorf*
- *Qiamp tissue kit*
- Mesin GeneAmp^RPCR system 2400

C. Prosedur kerja

Secara ringkas prosedur kerja dalam penelitian meliputi kegiatan isolasi sampai dengan deteksi gen exfoliatif (ETA dan ETB) dan gen enterotoksin (SEA dan SEB) pada isolat *Staphylococcus aureus* asal susu sapi perah dan susu kambing Desa Cijeruk, Bogor. Adapun tahapan penelitian sebagai berikut: desain primer, preparasi DNA, amplifikasi gen 23S rRNA, amplifikasi gen penyandi enterotoksin dan exfoliatif.

1. Desain Primer

Desain primer oligonukleotida spesifik untuk gen 23S rRNA, dan gen penyandi SEA, SEB, ETA, dan ETB dilakukan berdasarkan database dari *genbank* dengan menggunakan program Clustal W. pasangan primer dipilih pada daerah yang konserv. Selanjutnya primer oligonukleotida dianalisis dengan menggunakan *software Design Oligoprimer*. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi gen 23S rRNA dan gen penyandi SEA, SEB, ETA, dan ETB sebagai berikut:

Gene	F/R	Urutan basa	Produk PCR
23S rRNA	F R	AGCGAGTTACAAAGGACGAC AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	2720 bp
<i>sea</i>	F R	TTGGAAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	121 bp
<i>seb</i>	F R	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	477 bp
<i>eta</i>	F R	CTAGTGCATTTGTTATTCAA TGCATTGACACCATAGTACT	119 bp
<i>etb</i>	F R	ACGGCTATATACATTCAATT TCCATCGATAATATACCTAA	200 bp

2. Preparasi DNA

Molekul *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi dengan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai dengan prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Bakteri ditanam dalam media plat agar darah selama 18-24 jam, suhu 37⁰C. Kemudian, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam buffer TE 180 µl (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8, setelah itu, tambahkan 5 µl *lisostaphin* (1,8 U/µl). setelah itu, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37⁰C, tambahkan 25 µl proteinase K (14,8 mg/ml) dan 200 µl buffer AL (yang berisi reagen AL1 dan AL2). Suspensi bakteri diinkubasi selama dua jam pada suhu 56⁰C, kemudian dilakukan *vortex* supaya homogen. Suspensi dipanaskan pada suhu 95⁰C dalam waktu 10 menit, dan kemudian didinginkan pada suhu 4⁰C dalam waktu 10 menit, kemudian suspensi disentrifus 6000 g selama 15 menit. Sebanyak 420 µl etanol ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan menggunakan 500 µl buffer AW. Kolom *Qiamp* kemudian disentrifus 6000 g dalam waktu tiga menit, setelah itu tempatkan kolom di atas tabung *ependorf* dan DNA yang ada pada kolom dielusi dengan 200 µl buffer AE. Hasil eluat dari sampel DNA akan disimpan pada suhu -20⁰C (Salasia *et al.*, 2004).

3. Amplifikasi gen 23S rRNA dengan PCR (Coen, 2001)

Amplifikasi gen 23S rRNA dari *S. aureus* dengan PCR pada penelitian ini akan menggunakan mesin GeneAmp^RPCR system 2400 (Parkin Elmer). Proses amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94⁰C selanjutnya diikuti dengan 94⁰C selama 30 detik untuk denaturasi, 50-60⁰C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72⁰C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72⁰C. DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl

campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP_s, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta buffernya. Produk hasil PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarose 1,5% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam peranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefler, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ($\lambda = 300$ nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

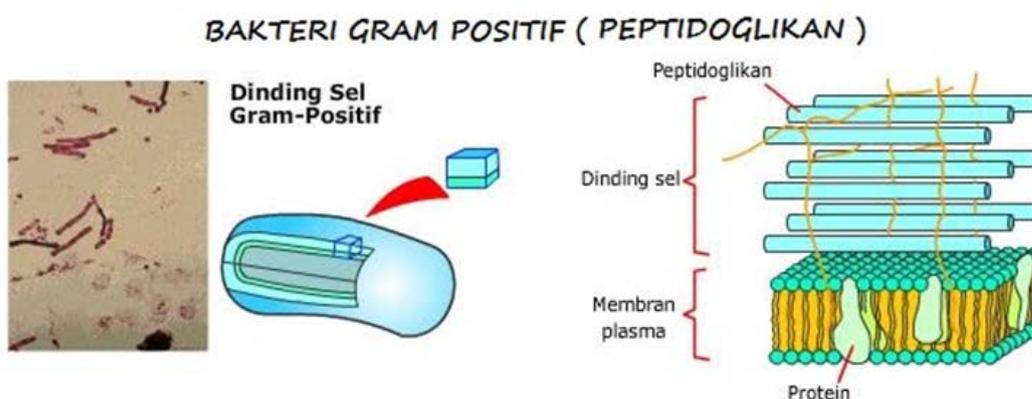
4. Amplifikasi gen enterotoksin dan exfoliatif

Amplifikasi gen enterotoksin dan exfoliatif dari *S. aureus* dengan PCR pada penelitian ini akan menggunakan mesin GeneAmp^RPCR system 2400 (Parkin Elmer). Proses amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94⁰C selanjutnya diikuti dengan 94⁰C selama 30 detik untuk denaturasi, 50-60⁰C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72⁰C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72⁰C. DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 μ l campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP_s, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta buffernya. Produk hasil PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarose 1,5% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam peranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefler, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ($\lambda = 300$ nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi DNA *Staphylococcus aureus*

Kegiatan preparasi genom DNA bakteri merupakan awal dari rangkaian kegiatan penelitian, dan *Qiamp tissue kit* produk Qiagen, Hilden, Jerman adalah kit yang digunakan untuk mengekstrasinya. Dalam preparasi tersebut terdapat perlakuan pemberian panas dan enzim katalitik. Hal tersebut dilakukan karena *Staphylococcus aureus* termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif yang memiliki karakteristik struktur dinding sel mengandung lapisan tebal peptidoglikan, protein, asam teikoat, asam teikuronat, dan polisakarida. Kondisi tersebut juga memungkinkan setiap unsur saling mengikat dengan ikatan kimia yang cukup kuat (Todar, 2005).



Gambar 1. Struktur dinding sel bakteri gram positif

Sumber: http://2.bp.blogspot.com/-KbIWlfdQOIk/T9ftApmUGZI/AAAAAAAAATI/dz_eqPHlyGI/s1600/New+Picture+%281%29.png

Fungsi penambahan EDTA dalam proses preparasi genom DNA bakteri dimaksudkan untuk mengikat ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} pada dinding sel bakteri sehingga komponen polisakarida mengalami hidrolisis. Ion magnesium tersebut berfungsi untuk mempertahankan integritas sel dan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat (Hugo & Russel, 1987). Penambahan lisozim pada proses pelisisan dinding sel bakteri merupakan lanjutan kegiatan preparasi genom DNA karena diketahui bahwa dinding sel *S. aureus* relatif sensitif terhadap enzim lisozim (Tortora *et al.*, 2007). Ditegaskan pula oleh Muladno (2002) enzim tersebut dapat menghidrolisis ikatan glikosidik β (1-4) dari N-acetylglucoseamine (NAG) dan N-acetylmuramic acid (NAM).

Selain itu, juga diberikan enzim proteinase K dengan tujuan untuk mendegradasi protein-protein pengotor yang terdapat pada isolat. Residu-residu pengotor (*debris*) dalam

bentuk protein, oligopeptida, dan sisa-sisa dinding sel selanjutnya diekstrak dengan pelarut organik untuk membantu denaturasi dan koagulasi protein. Protein sebagian besar akan mengalami presipitasi pada interfase antara fase organik dan fase *aqueous*. Fase *aqueous* yang bening dan mengandung DNA dipindahkan ke tabung eppendorf baru, melalui sentrifugasi dilakukan pembersihan *debris* sel sehingga diharapkan hanya tertinggal DNA.

Tahap berikutnya adalah penambahan garam, etanol, dan perlakuan dingin untuk mengendapkan DNA sehingga membentuk serabut-serabut berwarna putih. Di samping itu, penambahan etanol dimaksudkan juga untuk mencuci DNA dari oligonukleotida-oligonukleotida kecil, sisa-sisa deterjen, dan sisa-sisa pelarut organik pada waktu menghilangkan protein. Menurut Taylor *et al.* (2005), untuk menghindari terjadinya aktivitas enzim nuklease maka DNA yang diperoleh harus disimpan pada suhu -20°C .

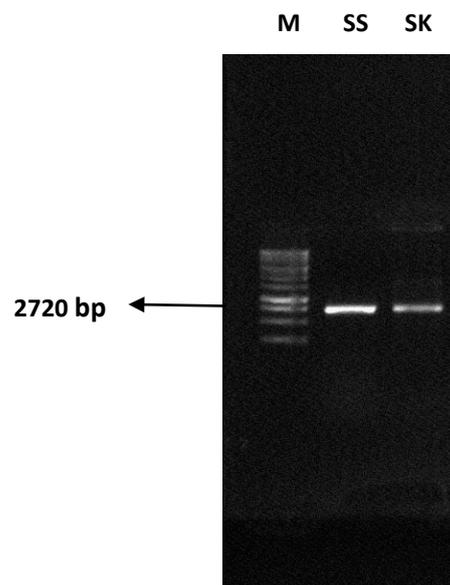
B. Amplifikasi gen 23S rRNA

Salah satu aktivitas molekuler yang terjadi di dalam Ribosom yakni saat molekul RNA bekerja membawa informasi genetik dari DNA sampai menjadi protein. Diketahui bahwa RNA ribosom (rRNA) merupakan komponen utama penyusun ribosom (65%), di samping protein, lemak, dan ion logam tertentu. Pada organisme prokariota, ribosom terdiri atas dua subunit, yakni subunit 50S (besar) dan subunit 30S (kecil). Subunit 50S berisi 23S, 5S rRNA, dan lebih dari 30 protein, sedangkan subunit 30S rRNA terdiri atas 16S dan 20 protein (Doolittle, 1999). Menurut De Rijk (1995) dan Cedergren *et al.* (1988), secara umum 16S dan 23S rRNA merupakan dasar dari pohon filogenetik, sementara 5S rRNA tidak, karena dianggap tidak mengandung sekuen cukup panjang sehingga tidak dapat digunakan untuk perbandingan statistik secara signifikan.

Menurut Ludwig & Schleifer (1994), mengapa gen 23S rRNA diunggulkan daripada gen 16S rRNA, diantaranya karena gen 23S rRNA mengandung sekuen lebih panjang, sisipan dan atau penghapusan yang unik, dan diprediksi memiliki resolusi filogenetik lebih baik karena variasi urutannya lebih tinggi. Bahkan ditegaskan pula oleh Hunt *et al.* (2006), bahwa gen 23S rRNA juga mengandung daerah *conserved* untuk mendesain primer dengan derajat kesamaan hampir sama dengan primer untuk gen 16S rRNA.

Pada penelitian ini, pemeriksaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan PCR yang merupakan metode uji mikrobiologis yang lebih sensitif jika dibandingkan dengan metode konvensional. Primer oligonukleotida yang digunakan pada penelitian ini merupakan primer oligonukleotida spesifik untuk amplifikasi target gen 23S rRNA. Amplifikasi gen 23S

rRNA dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa isolat yang digunakan. Ke dua isolat tersebut (*S.aureus* dari susu kambing dan susu sapi) setelah dilakukan elektroforesis dan diamati menggunakan UV iluminator, nampak adanya band pada ukuran 2720 bp, hal tersebut sesuai dengan ukuran primer untuk 23S rRNA *S.aureus* yang didesain. Jadi hal tersebut menguatkan bahwa ke dua isolat adalah *S.aureus*, dan sejalan dengan Pei *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa penggunaan spesifik primer untuk amplifikasi gen 23S rRNA terbukti bermanfaat untuk identifikasi spesies dari genus *Staphylococcus*. Kondisi reaksi PCR yang digunakan pada penelitian ini sesuai untuk mengamplifikasi gen 23S rRNA yang terdapat pada genom isolat *S. aureus*. Kriteria kondisi reaksi PCR yang dimaksud meliputi predenaturasi suhu 94°C, 5 menit, denaturasi 94°C, 40 detik, *annealing* 55°C, 1 menit, elongasi 72°C, 1 menit, postelongasi 72°C, 5 menit dengan siklus 35 kali putaran. Kesesuaian kondisi amplifikasi tersebut, tampak dari hasil amplifikasi gen 23S rRNA dengan dielektroforesis menggunakan 1,5% gel agarose, yang dilanjutkan dengan visualisasi pada UV transluminator. Pada Gambar 2 tampak *fragmen/band* 23S rRNA teramplifikasi sangat jelas, berpita tunggal, dan berukuran 2720 bp (sesuai dengan *database GeneBank*).



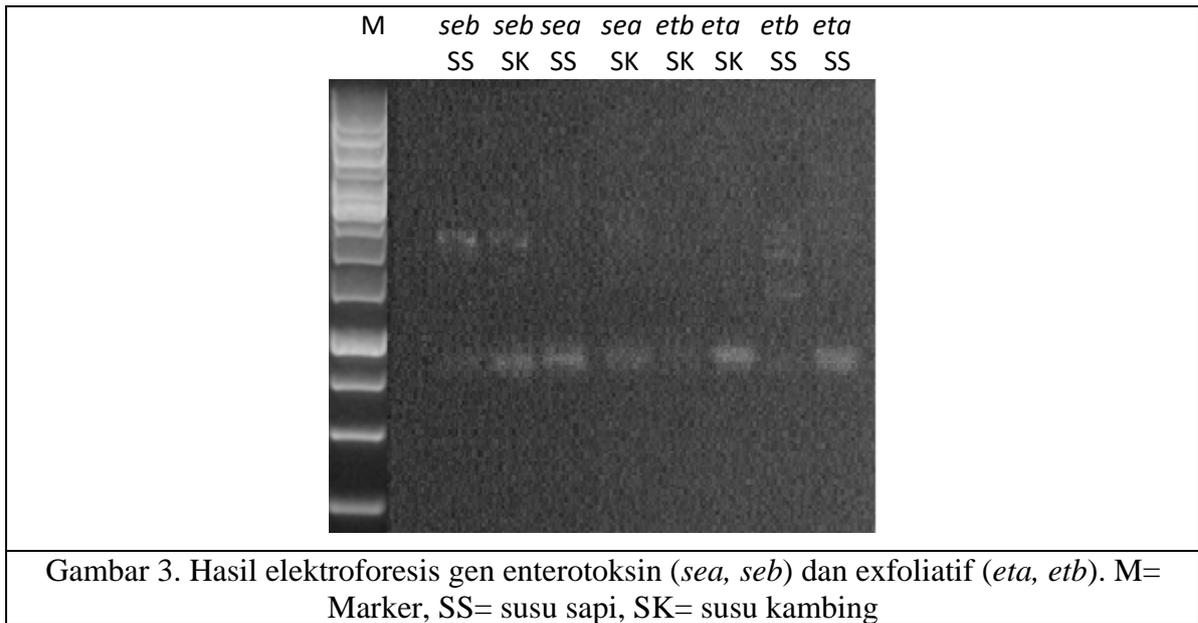
Gambar 2. Elektroforesis hasil amplifikasi gen 23S rRNA sampel *S. aureus* menggunakan agarose 1,5% berturut-turut M (marker), SS (susu sapi) dan SK (susu kambing).

C. Amplifikasi gen enterotoksin dan exfoliatif

Uji karakter keberadaan faktor virulensi dua isolat *S. aureus* yakni susu kambing dan susu sapi dilakukan dengan mengamplifikasi gen enterotoksin dan exfoliatif menggunakan metode PCR. Amplifikasi gen enterotoksin *S. aureus* dilakukan menggunakan primer khusus dengan program PCR yang ditetapkan berdasarkan referensi (Salasia *et al.*, 2001). Optimasi

yang dilakukan pada penelitian ini, menggunakan dua pasang primer oligonukleotida yaitu primer enterotoksin dan exfoliatif. Optimasi PCR menggunakan mix PCR Kapa Robust dengan konsentrasi 12,5 µl, primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R) masing-masing 1 µl, konsentrasi DNA *template* 1 µl dan konsentrasi ddH₂O sebanyak 9,5 µl untuk memenuhi volume akhir tiap sampel 25 µl. Tujuan optimasi PCR untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik, yaitu terbentuk pita DNA tebal dengan panjang sesuai yang diharapkan dan tidak terbentuk dimer primer, *smear*, atau *multiband* (Innis & Gelfand, 1990). Data sekuen isolat yang digunakan untuk merancang primer enterotoksin dan exfoliatif adalah data isolat yang diperoleh dari *GeneBank*. Primer enterotoksin (*sea* dan *seb*) dan exfoliatif (*eta* dan *etb*) didesain sendiri menggunakan program *primer3 online*.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 2 isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *sea*, *seb*, dan *eta*. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA dengan panjang spesifik (121 bp) untuk *sea*, 477 bp untuk *seb*, 119 bp untuk *eta*, baik pada susu sapi maupun susu kambing. Besaran panjang fragmen tersebut sesuai dengan produk PCR dari *database GeneBank* dan referensi. Menurut Omoe *et al.* (2002), sekitar 50% galur *S. aureus* memproduksi enterotoksin yang dapat menimbulkan keracunan makanan pada manusia. Adapun isolat yang memberikan hasil negatif (fragmen tidak muncul) adalah amplifikasi gen *etb* untuk susu sapi dan susu kambing. Hal ini mengindikasikan bahwa pada *S. aureus* kedua isolat tidak memproduksi exfoliatif khususnya *etb*. *S. aureus* yang dapat menghasilkan enterotoksin hanya sekitar 30%. Enterotoksin yang dilepaskan ke makanan berisiko menyebabkan keracunan makanan (*food intoxication*) pada konsumen (Halpin-Dohnalek dan Marth, 1989 yang dikutip oleh Forsythe dan Hayes, 1998). Terdapatnya *S. aureus* dalam jumlah besar pada makanan tidak berarti bahwa enterotoksin dihasilkan. Banyak faktor yang mempengaruhi produksi enterotoksin, antara lain jenis makanan, nilai pH (enterotoksin sedikit dihasilkan pada pH di bawah 5.0), suhu (suhu optimum produksi enterotoksin 37 °C, namun rentang suhu cukup lebar), keberadaan oksigen (produksi enterotoksin buruk pada kondisi anaerob) dan keberadaan mikroorganisme lain yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Forsythe & Hayes, 1998).



BAB V. KESIMPULAN

Berdasarkan uraian pembahasan dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan metode PCR dapat dideteksi adanya gen *sea*, *seb*, dan *eta* pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan susu kambing Desa Cijeruk, Bogor.

BAB VI. DAFTAR PUSTAKA

- Akineden. O, Annemuller.C, Hasan.A, Lammler. C, Wolter. W, Zschok, M. (2001). *Toxin genes and other characteristic of Staphylococcus aureus isolates from milk of cow with mastitis*. Clinical and Diagnostic Lab immunol 8 (5): 959-964
- Balaban, N. and Rasooly, A. (2000). *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol, 61, 1-10
- Ash, M. (2000). *Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins*. Dalam: Hocking, AD, Glenda A, Ian J, Ken N, dan Peter S. 2000. *Foodborne microorganisms of public health significance*. AISFT Food Microbiology Group. New South Wales
- Coen, D.M. (2001). *Current protocols in molecular biology: The Polymerase chain reaction*. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. (2000). *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13, 16–34.
- Forsythe, S.J. and Hayes, P.R. 1998. Food Hygiene, Microbiology and HACCP. Edisi ke-3. Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Gentina, Fionaliza,dan Nelisna, M. (2008). *Laporan Penyelidikan Epidemiologi Keracunan Pangan di Hotel Pangeran Padang. Padang*.
- Gilmour, A. and Harvey, J. (1990). *Staphylococci in milk and milk products*. J Appl Bacteriol 69:147–166.
- Hunt D.E, Klepac-Ceraj V, Acinas S.G, Gautier C, and Bertilsson S. (2006). *Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity*. Appl Environ Microbiol 72: 2221–2225
- Kitamoto, M., K. Kito, Y. Niimi, S. Shoda, A. Takamora, T. Hiramatsu, T. Akashi, Y. Yokoi, H. Hirano, M. Hosokawa, A. Yamamoto, N. Agata, N. Hamajima. (2009). *Food poisoning by Staphylococcus aureus at a university festival*. Jpn. J. Infect. Dis., 62.
- Kusumaningrum, E.N and B. Prasetyo. (2012). *Deteksi Gen Toxic Shock Toxin (tst) Isolat Staphylococcus aureus Asal Susu Sapi Perah dan Susu Kambing dari Bogor*. Laporan Penelitian. Tangerang. Lembaga Pusat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Terbuka.
- Ladhani, S., C.L. Joannou, D.P. Lochrie, R.W. Evans, and S.M. Poston. (1999). *Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome*. Clin. Microbiol. Rev. 12.

- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95: 38-43
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1994). *Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis*. *FEMS Microbiol Rev* 15: 155–173.
- Marrack, P. and J. Kappler (1990). *The staphylococcal enterotoxins and their relative*. *Science* 249:705-711.
- Nelson, F.K., Snyder, M., Gardner, A.F., Cynthia, L. H., Jay A. S., Gregory, J. P., George, M. C., Frederick, M. A., Jingyue Ju., Jan, K., and Barton, E. S. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology: Introduction and Historical Overview of DNA Sequencing*. John Wiley & Sons. New York
- Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D.L. Hu, Ueda, and K. Shinagawa. (2002). *Detection of Seg, Seh and Sei Genes in Isolates and Determination of Enterotoxin Productivities of Staphylococcus aureus Isolates Harboring Seg, Seh and Sei Genes*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 857-862
- Orwin. P.M, Leung. D.Y.M, Tripp, T.J, Bohach, G.A, Earhart. C.A, Ohlendorf. D.H, Schlievert. P.M. (2002). *Characterization of staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins*. *J Biochemistry* 41:14033-14040
- Salasia, S.I.O, Khusnan, Lammler. C, Zshock. M. (2004). *Comparative studies on Phenotypic and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java, Indonesia and Hesse, Germany*. *J Vet Res Sci* 5(2): 103-109.
- Suwito,W. (2010). *Bakteri yang sering mencemari susu: deteksi, pathogenesis, epidemiologi dan cara pengendaliannya*. *J. Litbang Pertanian* 29 (3).
- Todar, K. (2005). *Staphylococcus*. *J. Bacteriology*, University of Wisconsinmadison Departement of Bacteriology, Pp. 330.
- Thompson, N. E., E. Gomez-Lucia, and M. S. Bergdoll. (1986). *Incidence of antibodies reactive with toxic shock syndrome toxin 1 in bovine milk*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:865-867
- Tseng, C.W, Zhang, S, Stewart, G.C. (2004). *Accesory gene regulator control of Staphylococcal enterotoxin D gene expression*. *J Bacteriology*. 186: 1793-1801
- Williams, R.J, Ward, J.M, Henderson, B, Poole, O'Hara, B.P, Wilson, M, Nair, S.P. (2000). *Indentification of a novel gene cluster encoding staphylococcalexotoxin-like proteins:*

Characterization of the prototypic gene and its product. SET1. Infect Immun 68:4407-4415

Yarwood, J.M, McCprnick, J.K, Paustian, M.L, Orwin, P.M, Kapur ,V, Schlievert, P.M.
(2002). *Characterisation and expression analysis of Staphylococcus aureus pathogenicity island 3. J Biol Chem 277: 13147-13188*