

DETEKSI MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) PADA PASIEN RUMAH SAKIT DENGAN METODE MALDI -TOF MS DAN MULTIPLEX PCR

Dian Wahyu Kemalaputri¹, Siti Nur Jannah², Anto Budiharjo^{3*}

¹Progam Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

²Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang

*Email : dwkemaalaputri@gmail.com

ABSTRACT

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is a strain of *Staphylococcus aureus* which has been resistant to *methicillin* antibiotics and *-lactam* group. The mechanism of MRSA resistance occurs because the *Staphylococcus aureus* produces *Penicillin Binding Protein* (PBP2a) encoded by the *mecA* gene that has low affinity to *methicillin*. Nowadays, MRSA is tested by resistance test using *Oxacillin* 1 ug. This method requires pure isolate and bacterial culture, so that the results can be seen in 5 days. To find a rapid and precise diagnostic technique for detecting MRSA, *mecA* gene detection utilizing PCR multiplex technique as the alternative diagnostics. This study aims to find a quick and precise alternative diagnostic technique for MRSA examination, which is utilizing MALDI-TOF MS and multiplex PCR technique.

Keywords: MRSA, Staphylococcus aureus, MALDI-TOF MS, Multiplex PCR.

ABSTRAK

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) adalah strain *Staphylococcus aureus* yang telah mengalami resisten terhadap antibiotika *methicillin* dan golongan *-laktam*. Mekanisme resistensi MRSA terjadi karena *Staphylococcus aureus* menghasilkan *Penicillin Binding Protein* (PBP2a) yang dikode oleh gen *mecA* yang memiliki afinitas rendah terhadap *methicillin*. Saat ini MRSA diuji dengan cara uji resistensi dengan cara Cakram *Oxacillin* 1 ug. Cara ini memerlukan isolat murni dan kultur bakteri, sehingga hasilnya baru bisa diketahui paling cepat 5 hari. Dalam upaya untuk mencari teknik diagnostik yang cepat dan tepat untuk mendeteksi MRSA, deteksi gen *mecA* dengan teknik multiplex PCR merupakan salah satu diagnostik alternatif. Tujuan penelitian ini adalah mencari alternatif teknik diagnostik yang cepat dan tepat untuk pemeriksaan MRSA, dalam hal ini adalah dengan menggunakan MALDI-TOF MS dan teknik multiplex PCR.

Kata Kunci: MRSA, Staphylococcus aureus, MALDI-TOF MS, Multiplex PCR.

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus adalah salah satu bakteri Gram positif yang hidup pada membran mukosa manusia. Bakteri tersebut dapat melakukan kolonisasi pada nasal sehingga menyebabkan peningkatan risiko infeksi saat terjadi luka (Champoux, 2004). Risiko infeksi menjadi lebih tinggi karena bakteri tersebut memiliki faktor virulensi yang beragam. Pengobatan akibat infeksi *S. aureus* umumnya menggunakan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan ataupun membunuh bakteri tersebut. Akan tetapi muncul strain bakteri yang resistan terhadap antibiotik yang mempersulit proses pengobatan sehingga infeksi terus menyebar dan biaya pengobatan pasien semakin meningkat (Madigan, 2012).

Salah satu strain *S. aureus* yang resistan antibiotik adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Strain tersebut resisten terhadap antibiotik *methicillin* dan antibiotik golongan β -laktam. Resistensi terjadi akibat ekspresi jenis *penicillin binding protein* (PBP2a) yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam. Afinitas yang rendah menyebabkan PBP2a tidak berikatan dengan antibiotik golongan β -laktam sehingga biosintesis peptidoglikan tetap berjalan. Ekspresi protein PBP2a terjadi karena adanya elemen genetik *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) yang membawa gen *mecA* sebagai pengkode PBP2a (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

MRSA merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, yaitu infeksi yang didapatkan di rumah sakit yang berupa infeksi pascaoperasi, infeksi saluran pernapasan, infeksi saluran urin maupun infeksi peredaran darah (Madigan, 2012). Infeksi MRSA menyebar ke seluruh dunia dengan jumlah yang terus meningkat selama 10 tahun terakhir. Menurut Green (2012), prevalensi MRSA di wilayah Asia seperti Jepang dan Singapura mencapai lebih dari 50% sedangkan di wilayah Amerika, Australia, beberapa negara Eropa berkisar antara 25-50%. Prevalensi di wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia belum banyak diketahui karena penelitian mengenai MRSA masih sedikit.

Penelitian mengenai deteksi MRSA dilakukan dengan sampel pasien RSCM. Tahapan pertama dilakukan identifikasi bakteri pada sampel pasien RSCM. Identifikasi bakteri pada tingkat spesies dari isolat klinis secara akurat merupakan hal yang sangat penting. Karena, dengan mengetahui spesies suatu bakteri, maka akan dengan mudah diketahui mekanisme patogenitas dan penanganan yang tepat terkait penyakit yang ditimbulkan bakteri tersebut. Salah satu metode identifikasi mikroorganisme yang saat ini banyak dikembangkan oleh para peneliti adalah menggunakan *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Spektrometri massa MALDI-TOF merupakan metode yang dilakukan untuk identifikasi bakteri yang memiliki keunggulan yaitu pengoperasian yang mudah, analisis sampel dalam skala besar, akurasi tinggi, dan efisiensi waktu deteksi lebih tinggi daripada metode biokimia tradisional. (Wang et al., 2013).

Deteksi penyakit MRSA secara molekuler dilakukan dengan metode multiplex PCR. Metode multiplex PCR gen *nuc* dan *mecA* digunakan karena memiliki kelebihan, yaitu, dapat mengidentifikasi gen *virulen Staphylococcus aureus* dan waktu pengerjaan lebih efektif. Selain itu metode ini dapat menghemat penggunaan bahan pada proses pembuatan *master mix* untuk proses amplifikasi gen dan dapat mentarget beberapa gen dalam satu proses amplifikasi gen.

Hasil yang didapatkan diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keakuratan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, membedakan sampel MRSA dan MSSA (*Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus*) menggunakan metode spektrometri massa MALDI-TOF dan deteksi MRSA secara molekuler dengan multiplex PCR.

METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Molecular Bacteriology Eijkman Institute Jl. P. Diponegoro No.69, Kompleks Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Daerah Khusus Ibukota Jakarta dimulai pada bulan April hingga Juni 2017.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *laminar air flow*, *safety cabinet*, timbangan digital, gelas ukur, erlenmayer, magnetic stirer, pH-meter, autoklaf, waterbath, cawan petri steril, inkubator, lup inokulasi 10 μ L, lup inokulasi 1 μ L, Komputer dan spektrometri MALDI-TOF tipe Microflex dengan MSP 96 ground steel plate, *biomedical freezer*, mikropipet, *tips*, *cryotube*, *vortex*, *centrifuge*, *spin down*, mesin PCR, peralatan elektroforesis, *microwave*, Gel-Doc 1000.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *medium TSA (Tryptone Soya Agar)*, bubuk TSA, ddH₂O, *medium BA (Blood Agar)*, darah domba steril, stok isolat bakteri *Staphylococcus aureus* koleksi Lembaga Biologi Molekuler Eijkman yang disimpan dalam medium STGG (*Skim milk, Tryptone, Glucose, Glycerine*), aquades MALDI-TOF MS, TFA 2,5%, *ethanol 70%*, *ethanol 100%*, *formic acid 70%*, *acetonitrile*, air suling, *bleach*, *iodine*, *matrix HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid)*, BTS, *malDI mapping*, sampel DNA, ATCC 25923, *go taq green (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, dan bufer reaksi)*, *nuclease free water*, *primer nuc forward and reverse*, *primer mecA forward and reverse*, bubuk agarosa, larutan buffer TAE, *DNA ladder 100bp*, *SYBR Safe*, tisu, label, *aluminium foil*.

Prosedur

Subkultur Bakteri

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 136 sampel didapat dari isolat murni koleksi milik Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Sekitar 10 μ L sampel digoreskan menggunakan lup inokulasi ke dalam 8% sheep blood agar menggunakan metode cawan kuadran untuk mengamati reaksi -hemolisis. Kemudian medium diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob. Profil koloni dan reaksi hemolisis diamati setelah 24 jam. Koloni yang memiliki reaksi -hemolisis terbesar kemudian diambil menggunakan lup inokulasi 1 μ L dan ditanam ulang pada medium TSA (*Tryptone Soya Agar*) untuk mendapatkan kultur murni.

Identifikasi sampel menggunakan MALDI-TOF MS

1. Preparasi Sampel (Matsuda *et al.* 2012). Sampel dipreparasi menggunakan metode *direct colony*. Sekitar satu koloni murni bakteri yang akan diidentifikasi disentuh menggunakan tusuk gigi kayu steril kemudian dioleskan ke salah satu spot yang ada pada *plate*. *Plate* yang digunakan adalah jenis *msp 96 ground steel target plate*. Pengolesan dilakukan secara merata sampai membentuk lapisan tipis. Sampel dibiarkan mengering pada suhu ruang sekitar 1 menit. Kemudian, sampel yang telah kering dilapisi dengan 1 μ L larutan matriks (larutan jenuh dari *-cyano-4-hydroxycinnamic acid* (HCCA) dalam 50% *acetonitrile* dan 2,5 % *trifluoroacetic acid* (TFA)). Sampel dibiarkan mengering dan terkristalisasi pada suhu ruang sekitar 10 menit. Untuk preparasi sampel dengan metode ekstraksi protein, beberapa koloni isolat disuspensikan kedalam 300 μ L air distilasi dan dicocokkan dengan standar McFarland 2, kemudian ditambahkan 900 μ L etanol absolut. Suspensi divortex lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan pada suhu 55°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 50 μ L *formic acid 70%* dan 50 μ L *acetonitrile 70%* dan sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya, 1 μ L supernatan diteteskan pada spot plate dan dibiarkan mengering selama 10

menit pada suhu ruang. Terakhir, ditambahkan 1 μ L matrix HCCA pada spot seperti pada metode *direct colony*.

2. Parameter MALDI-TOF-MS (Veen et al. 2010). Identifikasi dilakukan dengan spektrometer massa MALDI-TOF tipe Microflex (Bruker) menggunakan perangkat lunak flexControl 3,4. Spektrum yang direkam dalam mode linear positif dengan frekuensi laser sebesar 60 Hz dan *mass range* diatur dari 2.000 sampai 20.000 Da. Tegangan listrik dari sumber ion 1 dan 2 masing-masing diatur sebesar 20kV dan 18,5 kV ; voltase lensa, 9,1 kV. Protein BTS (*Bacterial Test Standard*) digunakan secara berkala sebagai kalibrasi instrumen. Spektrum hasil dipindahkan ke perangkat lunak BioTyper RTC dan kemudian proses identifikasi secara otomatis akan berlangsung. Skor hasil logaritma yang direkomendasikan oleh pembuat digunakan sebagai kriteria identifikasi. Skor dibawah 1.700 menunjukkan bahwa sampel tidak teridentifikasi sempurna. Sampel yang memiliki skor 1.700 – 1.999 menunjukkan hasil identifikasi telah sampai ke tingkat genus dan yang memiliki skor 2.000 – 3.000 menunjukkan sampel telah teridentifikasi sampai ke tingkat spesies.

3. Analisis Spektrum Massa (Werno et al. 2012). Analisis spektrum massa dilakukan menggunakan *software flexAnalysis*. Semua spektra yang telah diambil dan disimpan dari *software flexControl* di buka, kemudian dilakukan proses kalibrasi, *smoothing* dan *baseline subtraction* berdasarkan pengaturan standar yang terdapat pada *flexAnalysis MBT-Standard*. Kemudian spektra yang terbentuk diamati. Keberadaan atau ketiadaan sebuah *peak* pada spektrum massa diamati, karena merupakan sebuah pembeda dari satu spektrum dengan spektrum lainnya (keberadaan sebuah *peak* diasumsikan bahwa *peak* tersebut terdapat pada semua spektrum lain dari isolat yang sama).

Ekstraksi DNA (Kowalchuk, 2004)

Tahapan Ekstraksi DNA mengacu pada Kowalchuk (2004) dengan modifikasi. Ekstraksi DNA menggunakan kultur murni hasil inkubasi 24 jam pada medium TSA. Kultur bakteri diambil dengan lup inokulasi 10 μ L dan di masukkan ke dalam tabung berisi 500 μ L TE buffer. Suspensi tersebut kemudian divortex dan dipanaskan pada suhu 97°C selama 5 menit. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 5 menit kemudian sentrifugasi pada kecepatan 13.000 x g selama 10 menit. Setelah dilakukan sentrifugasi akan terlihat 2 lapisan yaitu supernatan (bagian atas) dan pelet (endapan) pada bagian bawah. Supernatan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam tabung baru dan disimpan pada lemari pendingin -30°C.

Amplifikasi Gen *nuc* dan *mecA* dengan metode multiplex PCR

Gen yang digunakan untuk amplifikasi adalah gen *nuc* dan *mecA* yang dilakukan secara bersamaan di dalam suatu reaksi PCR. Reaksi PCR dibuat dengan membuat *master mix* yang terdiri atas beberapa komponen yaitu PCR H₂O, Go tag® Green, primer *nuc forward* [5'-TCAGCAAATGCATCACAAACAG-3'], primernuc reverse [5'-CGTAAATGCACTTGCTTCAGG-3'], primer *mecA forward* [5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'], primer *mecA reverse* [5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3'], dan sampel DNA. *Master mix* terdiri atas PCR H₂O 7,5 μ L, Go tag® Green 12,5 μ L, primer *nuc f* 0,5 μ L, primer *nuc r* 0,5 μ L, primer *mecA f* 0,5 μ L, primer *mecA r* 0,5 μ L dengan total volume 25 μ L untuk tiap satu kali reaksi. Kontrol positif yang digunakan adalah sampel DNA dengan kode 2743 dari penelitian lain yang telah diketahui positif gen *nuc* dan *mecA* dan ATCC 25923. Kontrol negatif yang digunakan adalah ddH₂O. Tabung PCR kemudian dimasukkan ke dalam alat spin down beberapa detik kemudian dimasukkan ke dalam alat PCR dengan pengaturan 94°C selama 5 menit, 94°C selama 30 detik, 55°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, 72°C selama 10 menit, dan *hold* 4°C.

Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis gel

Setelah amplifikasi DNA dilakukanlah elektroforesis. Tahapan pertama adalah dengan membuat gel agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan 1,6 g bubuk agarosa ke dalam 80 mL larutan TAE 1X. Campuran tersebut digoyang-goyang lalu di panaskan di *microwave* selama ± 2

menit dan didiamkan hingga larutan dingin. Setelah larutan dingin ditambahkan *SYBR safe* sebanyak 3 μL dan kemudian tuangkan larutan gel agarosa ke dalam cetakan yang sudah berisi sisir dengan jumlah sumur yang dibutuhkan dan didiamkan ± 30 menit hingga gel agarosa mengeras. Gel agarosa yang telah mengeras diambil sisirnya kemudian dipindahkan ke dalam tempat elektroforesis dan diberi larutan TAE 1X hingga gel terendam. Produk hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa sebanyak 5 μL menggunakan mikropipet. *DNA ladder 100bps* sebanyak 5 μL dimasukkan pada sumur pertama sebagai standar ukur pita. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 100 V. Hasil elektroforesis didokumentasikan dengan *gel doc* dengan *software Quantity One*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Subkultur Bakteri

Sebanyak 136 isolat dari total 136 isolat murni *S.aureus* dapat ditumbuhkan. Setelah diamati, hasil yang di dapat adalah 133 sampel menunjukkan reaksi positif α -hemolisis yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni seperti yang dilihat pada Gambar 1, dan terdapat 3 sampel yang menunjukkan reaksi negatif α -hemolisis yaitu sampel 41.785, 50.802, dan 122.971. Kemudian 133 sampel yang menunjukkan reaksi positif α -hemolisis ditanam ulang pada medium *TSA (Tryptone Soya Agar)* untuk mendapatkan kultur murni. Sedangkan, 3 sampel yang menunjukkan reaksi negatif α -hemolisis tetap ditanam ulang pada medium *TSA* untuk diidentifikasi menggunakan *MALDI-TOF MS*.



Gambar 1. Reaksi Positif Uji α -hemolisis *S. aureus* pada medium *Blood Agar*

Menurut Madigan (2012), Koloni *S.aureus* akan berwarna kekuningan dan menunjukkan reaksi α -hemolisis yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Reaksi α -hemolisis terjadi karena sekresi α -toksin yang merusak ikatan lipid bilayer pada membran plasma sehingga membran plasma rusak dan sel lisis. Sel darah merah menyebabkan agar darah di sekitar koloni menjadi bening.

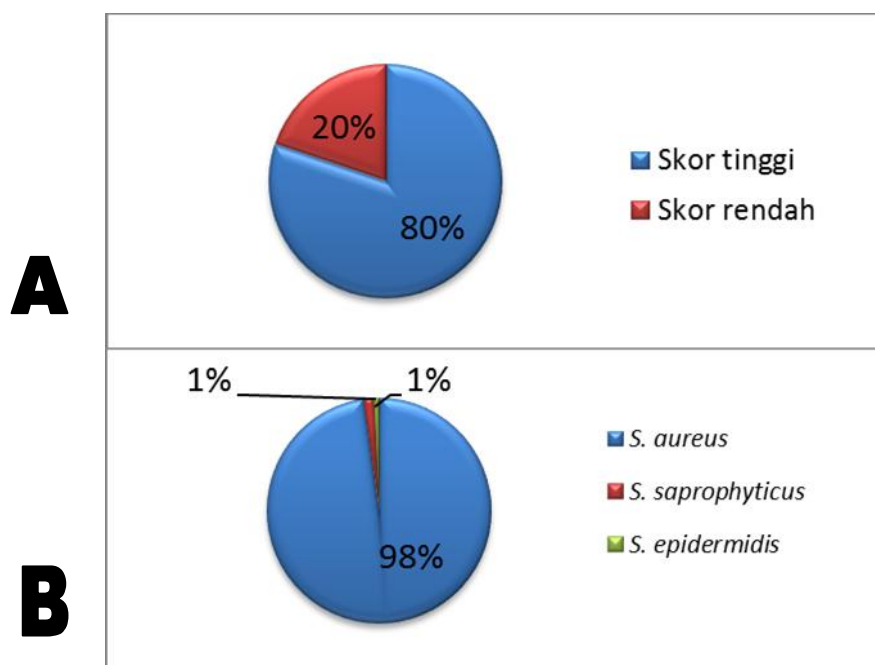
Identifikasi sampel menggunakan *MALDI-TOF MS*

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) merupakan salah satu jenis spektrometri massa yang saat ini banyak digunakan. Prinsip spektrometri jenis ini adalah menggunakan metode *soft ionization*. Metode ini mengakibatkan biomolekul nonvolatil yang berukuran besar, seperti protein mengalami ionisasi dan menguap sehingga akan terdeteksi oleh detektor. Proses ini akan menghasilkan ion bermuatan tunggal, sehingga nantinya rasio massa analit terhadap muatannya (m/z) adalah sebesar massanya itu sendiri (DeCarolis *et al.*, 2014).

Proses identifikasi menggunakan *MALDI-TOF MS* dilakukan berdasarkan kesamaan secara logaritma antara spektrum protein yang diperoleh dari sel maupun ekstrak sel dengan spektrum acuan yang ada pada database. Hasil perbandingan ini akan ditampilkan dalam bentuk skor. Skor

dibawah 1.700 menunjukkan bahwa sampel tidak teridentifikasi sempurna. Sampel yang memiliki skor 1.700 – 1.999 menunjukkan hasil identifikasi telah sampai ke tingkat genus dan yang memiliki skor 2.000 – 3.000 menunjukkan sampel telah teridentifikasi sampai ke tingkat spesies (Werno *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa MALDI-TOF dapat mengidentifikasi 136 (100%) isolat yang berasal dari pasien RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo) Jakarta.

MALDI-TOF dapat mengidentifikasi 136 (100%) isolat yang berasal dari pasien RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo) Jakarta. Berdasarkan hasil identifikasi MALDI-TOF terhadap 136 isolat, dapat terlihat semua bakteri berasal dari genus yang sama, yaitu *Staphylococcus*. Hasil identifikasi keseluruhan isolat menunjukkan bahwa 27 isolat (20%) yang mempunyai skor rendah yaitu antara 1.700-1.999. Sisanya, sebanyak 109 isolat (80%) memiliki skor yang tinggi, yaitu dengan skor di atas 2.000. Skor tinggi menunjukkan tingkat kepercayaan berada sampai tingkat spesies, sedangkan skor rendah menunjukkan tingkat kepercayaan hanya sampai tingkat genus. Hasil identifikasi spesies berdasarkan skor tinggi dan rendah, serta hasil identifikasi spesies 136 sampel menggunakan MALDI-TOF MS dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. [A] Hasil identifikasi spesies berdasarkan skor tinggi dan skor rendah. [B] Hasil identifikasi spesies 136 sampel menggunakan MALDI-TOF MS

Hasil identifikasi menunjukkan, spesies bakteri yang paling banyak ditemukan adalah *Staphylococcus aureus* sebanyak 133 sampel (98%), *Staphylococcus saprophyticus* sebanyak 2 sampel (1%), dan *Staphylococcus epidermidis* sebanyak 1 sampel (1%).

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan MALDI-TOF MS terhadap 136 isolat, dapat terlihat bahwa semua bakteri berasal dari genus yang sama, yaitu *Staphylococcus*. Sebanyak 27 isolat (20%) yang berhasil diidentifikasi menunjukkan perolehan skor yang rendah. Ketidakmampuan MALDI-TOF dalam memberikan hasil identifikasi keseluruhan dengan skor yang tinggi dapat diakibatkan karena spektrum acuan pada database untuk satu spesies terdapat dalam jumlah yang banyak, sehingga untuk satu spesies saja memiliki variasi ekspresi protein acuan yang beragam (Alaatom *et al.*, 2011).

Perbandingan Hasil Identifikasi *S.aureus* Menggunakan Metode Preparasi Ekstraksi Protein dan *Direct Colony*

Preparasi sampel dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu mengoleskan koloni secara langsung (*direct colony*) pada *plate* dan melalui ekstraksi protein. Kedua metode ini dapat digunakan pada bakteri Gram positif dan Gram negatif. Keuntungan metode *direct colony* adalah lebih simpel dan lebih cepat dibandingkan metode ekstraksi yang membutuhkan waktu, reagen dan peralatan yang lebih banyak (Alaatom *et al.*, 2011). Metode *direct colony* merupakan metode preparasi yang paling umum digunakan oleh berbagai penelitian (Schulthess *et al.*, 2013). Ketika identifikasi tidak berhasil dilakukan dengan metode ini, barulah dilakukan metode preparasi lainnya yaitu ekstraksi protein yang diduga akan memberikan hasil yang lebih baik.

Sebanyak 10 sampel (5 MRSA dan 5 MSSA) yang memiliki skor identifikasi rendah diambil secara acak untuk dilakukan proses identifikasi ulang menggunakan metode preparasi yang berbeda, yaitu metode ekstraksi protein. Metode ekstraksi protein dianjurkan dilakukan pada sampel yang memiliki skor identifikasi rendah hasil preparasi menggunakan metode *direct colony*. Perlakuan ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan hasil identifikasi menggunakan kedua jenis metode preparasi. Hasil identifikasi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan hasil identifikasi *S.aureus* menggunakan metode preparasi ekstraksi protein dan *direct colony*

Sampel	Hasil Identifikasi (Skor)	
	<i>Direct Colony</i> (m/z)	Ekstraksi Protein (m/z)
STGG 3.486	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.465	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.190
STGG 4.505	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.295	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.427
STGG 5.671	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.370	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.294
STGG 8.711	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.318	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.304
STGG 9.707	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.352	<i>no peaks</i>
STGG 10.713	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.382	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.452
STGG 11.254	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.332	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.341
STGG 12.8	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.285	<i>S. aureus</i> (MSSA) = 2.351
STGG 15.747	<i>no peaks</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.307
STGG 19.510	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.292	<i>S. aureus</i> (MRSA) = 2.389

*)MRSA : *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

*)MSSA : *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus*

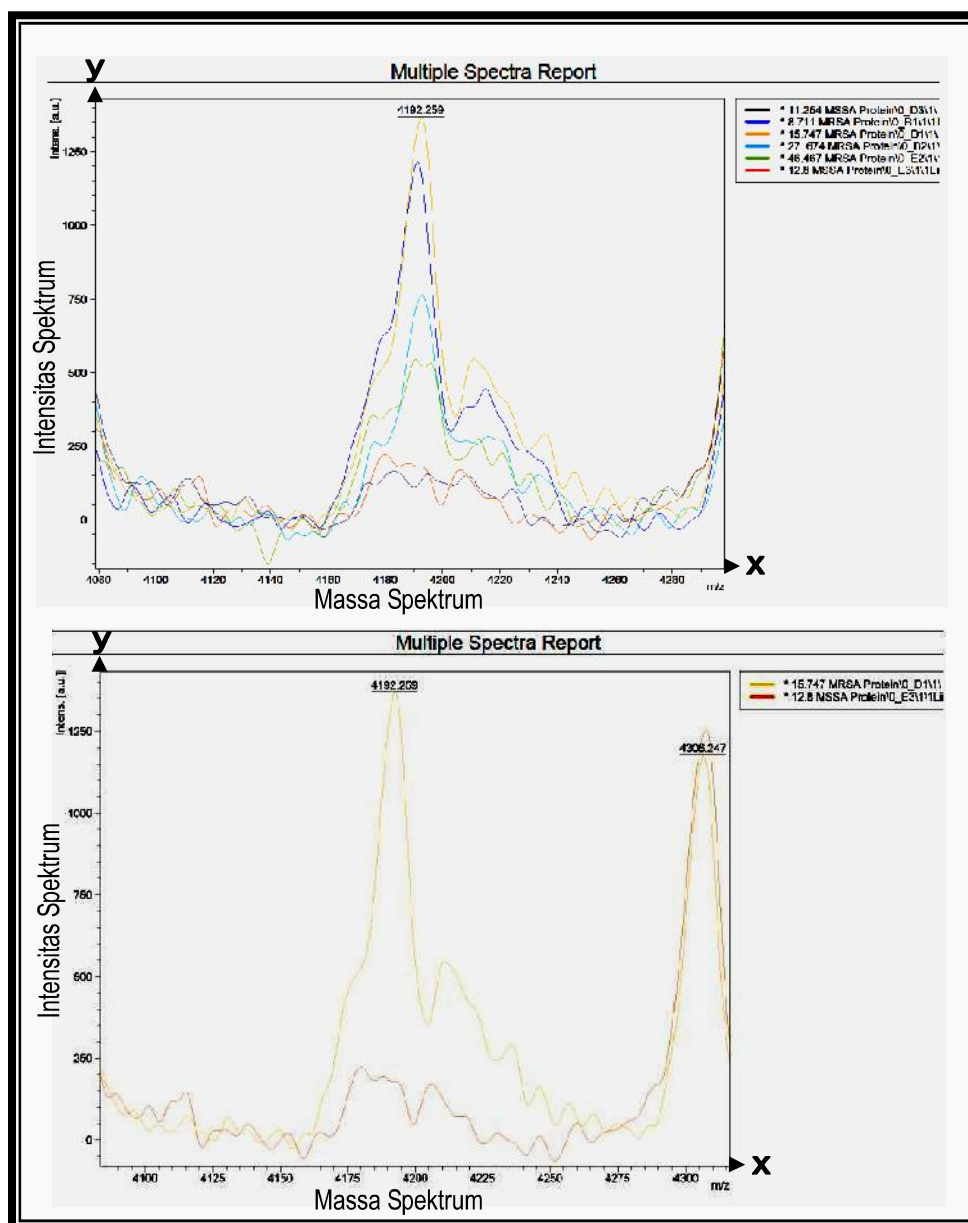
Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa kedua metode preparasi tidak memberikan perbedaan yang begitu spesifik. Hal ini terlihat dari perolehan skor setiap sampel yang tidak stabil, ada skor yang tinggi dengan metode *direct colony* dan ada yang lebih tinggi dengan metode ekstraksi protein, bahkan terdapat hasil *no peaks* pada kedua metode tersebut. Satu-satunya perbedaan yang berhasil didapatkan dari kedua jenis metode ini adalah mengenai kualitas spektrum yang dihasilkan. Kualitas spektrum yang dihasilkan dari metode preparasi secara ekstraksi biasanya sedikit lebih bagus dibandingkan dengan metode *direct colony*. Hal ini dikarenakan pada metode ekstraksi protein akan dihasilkan protein yang lebih murni. Metode *direct colony* menghasilkan spektrum yang tidak terlalu bagus kemungkinan karena pada sampel yang sudah terkristalisasi masih terdapat beberapa komponen lain, seperti berbagai metabolit, pigmen, dan bahkan agar (Alaatom *et al.*, 2011).

Diferensiasi MRSA dan MSSA dengan analisis spektrum massa

Identifikasi MRSA dan MSSA umumnya dilakukan dengan metode secara molekuler melalui multiplex PCR dan uji sensitivitas antibiotik. Metode tersebut memerlukan waktu deteksi yang lama dan membutuhkan biaya yang mahal. Ayman (2016) telah berhasil mengembangkan metode MALDI-TOF-MS melalui analisis spektrum massa untuk membedakan MRSA dari MSSA sehingga

memberikan pilihan baru dalam identifikasi dan pengendalian penyakit MRSA secara cepat dan efektif.

Analisis keberadaan puncak spesifik pada masing-masing spektrum dilakukan pada spektrum sampel yang sebelumnya sudah di pastikan merupakan MSSA dan MRSA melalui amplifikasi DNA dengan metode multiplex PCR gen *nuc* dan *mecA*. Proses ini dilakukan dengan menganalisis spektrum dari total 6 sampel, yaitu 2 sampel MSSA (sampel STGG 11.244 dan STGG 12.8) dan 4 sampel MRSA (sampel STGG 8.711, STGG 15.747, STGG 27.674, dan STGG 46.467). Keberadaan puncak spesifik pada (4192,259 Da) terdeteksi pada sampel MRSA, dan tidak terdeteksi pada sampel MSSA dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Keberadaan puncak spesifik pada (4192,259 Da) terdeteksi pada sampel MRSA, dan tidak terdeteksi pada sampel MSSA

Setelah dilakukan analisis, puncak pembeda dari 2 sampel MSSA (sampel STGG 11.244 dan STGG 12.8) dan 4 sampel MRSA (sampel STGG 8.711, STGG 15.747, STGG 27.674, dan STGG 46.467) adalah pada spektrum dengan nilai 4192,259 Da. Keberadaan puncak spesifik pada

spektrum dengan nilai 4192,259 Da hanya terdeteksi pada sampel MRSA, dan tidak terdeteksi pada sampel MSSA.

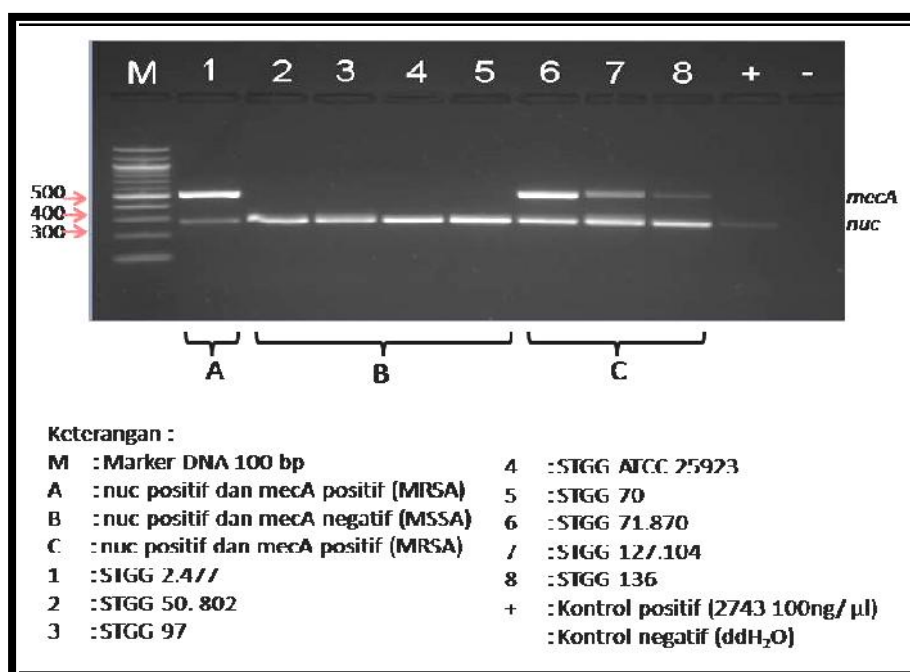
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ayman (2016), terlihat bahwa keberadaan puncak spesifik sebagai pembeda MRSA dan MSSA dapat dilihat berkisar antara 3.800 sampai 5.900 Da. Dimana, *higher peaks intensity* hanya dapat terlihat pada sampel MRSA dan tidak terlihat pada sampel MSSA.

The principal component analysis (PCA) atau Analisis komponen utama dianggap sebagai alat matematika tambahan yang digunakan dalam dataset yang dianalisis untuk memvisualisasikan tingkat kemiripan dan keragaman spektrum protein.

Amplifikasi Gen *nuc* dan *mecA* dengan metode multiplex PCR

Amplifikasi gen *nuc* dan *mecA* dilakukan menggunakan metode multiplex PCR. Multiplex PCR merupakan teknik amplifikasi menggunakan lebih dari 1 primer untuk beberapa target berbeda di dalam suatu reaksi PCR. Kelebihan dari metode ini adalah dapat menghemat volume DNA yang digunakan, waktu pengerjaan yang lebih efektif serta mengurangi biaya untuk amplifikasi DNA (Sambrook & Russel, 2001).

Hasil amplifikasi gen *nuc* dan *mecA* diamati dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa. Hasil amplifikasi akan terlihat sebagai pita DNA yang terpisah sesuai dengan ukurannya (Gambar 4.). Pita DNA untuk gen *nuc* terlihat diantara 200bp dan 300 bp sedangkan pita untuk gen *mecA* terlihat di antara 500 bp dan 600 bp.



Gambar 4. Visualisasi hasil amplifikasi gen *nuc* dan *mecA*

Kontrol positif digunakan untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi DNA serta pembandingan hasil amplifikasi pada DNA sampel. Kontrol positif yang digunakan merupakan isolat bakteri dengan kode 2743 yang telah diketahui dari penelitian sebelumnya memiliki gen *nuc* serta gen *mecA*. Suhu *annealing* yang digunakan pada metode multiplex PCR adalah 55°C.

Hasil Amplifikasi gen *nuc* dan *mecA* dengan metode multiplex PCR sebanyak 136 sampel menunjukkan 37 sampel positif MRSA dan sebanyak 99 sampel negatif MRSA yang merupakan MSSA. Hasil positif MRSA dapat dibuktikan dengan multiplex PCR yang menunjukkan adanya pita gen *nuc* dan pita gen *mecA* pada sampel STGG 2.477, STGG 71.870, STGG 127.104, dan STGG 136. Hasil negatif MRSA dapat dibuktikan dengan PCR yang menunjukkan di sampel STGG 50.802,

STGG 97, STGG 97, STGG ATCC 25923, dan STGG 70 hanya terdapat pita gen *nuc*. Hasil negatif tersebut menunjukkan bahwa 99 sampel lainnya hanya *Staphylococcus aureus* biasa bukan MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*).

KESIMPULAN

MALDI-TOF MS dapat mengidentifikasi semua isolat yang menunjukkan semuanya merupakan genus *Staphylococcus*. Sebanyak 80,15% isolat memiliki skor yang tinggi dan 19,85% isolat memiliki skor rendah. Metode MALDI-TOF MS dapat digunakan untuk diferensiasi sampel MRSA dan MSSA berdasarkan hasil analisis spektrum massa yang terdeteksi pada 4192,259 Da. Metode multiplex PCR gen *nuc* dan *mecA* dapat digunakan untuk mendeteksi MRSA dengan didapatkannya sebanyak 37 sampel MRSA yang memiliki gen *mecA* dari sampel pasien RSCM (Rumah sakit Cipto Mangunkusumo).

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang selalu memberikan rahmat, nikmat dan hidayah serta karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah publikasi yang berjudul “Deteksi MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) pada Pasien Rumah Sakit dengan Metode MALDI-TOF MS dan Multiplex PCR”. Penulis mengharapkan adanya masukan, kritik dan saran yang membangun untuk penelitian selanjutnya. Penulis menyadari masih banyaknya kekurangan dalam penulisan naskah publikasi ini, maka sebelumnya penulis mohon maaf apabila terdapat kesalahan kata-kata yang kurang berkenan dan kami memohon kritik dan saran yang membangun demi perbaikan di masa yang akan datang.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. 2011. *Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram positive cocci by use of broker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*. *J Clin Microbiol*. 49(8): 2868-2873.
- Ayman E, MUSAAD AD, Eman M, Salama O, Husam E. 2016. *Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of Staphylococcus species isolated from bovine mastitis*. *Microbiology Open published by John Wiley & Sons Ltd*.
- Champoux, J.J., W.L. Drew, F.C. Neidhardt & J.J. Plorde. 2004. *Sherris medical microbiology*. 4th Ed. Mc. Graw Hill, USA: xvi + 997 hlm.
- DeCarolus ED, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, Posteraro B, Sanguinetti M. 2014. *Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. *J Infect Dec Ctries*. 8(9): 1081-1088.
- Deurenberg R.H. and E.E. Stobberingh. 2008. *The evolution of Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8: 747–763.
- Green, B.N., Johnson, C.D., Egan, J.T., Rosenthal, M. Griffith, E.A., Evans, M.W., 2012. *Methicillin Resistant Saphylococcus aureus: an overview for manual therapist*, *Journal of Chiropractic Medicine*, 11: 64-76.
- Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD, 2004. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Ed ke-2. Volume ke-1. Dordrecht (NL): Kluwer Academic Publishers. hlm 3-18.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganism 13th Ed.* Benjamin Cummings, San Fransisco : xxvii+1155hlm.
- Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y, Hiramatsu K, Kukuchi K. 2012. *Evaluation of simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.* J Clin Microbiol. 50(12) : 3862-3866.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schulthless B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Bottger EC, Hombach M. 2013. *Identification of gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostic.* J. Clin. Microbiol. 51(6): 1834-1840.
- Veen SQV, Claas ECJ, Kuijper EJ. 2010. *High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories.* Journal of Clinical Microbiology. 48 (3): 900-907.
- Wang L, Barrett JF. 2007. *Methods in Molecular Biology: Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Protocols.* Totowa-New Jersey; Humana Press Inc.,:209-20.
- Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. 2012. *Differentiation of Streptococcus pneumoniae from nonpneumococcal streptococci of the Streptococcus mitis group by matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry.* J Clin Microbiol. 50(9): 2863-2867.