

Gen Exfoliatif A (EtA) *Staphylococcus aureus* pada Isolat Luka Pasien Diabetes Mellitus**Suliaty**Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; suli_ati@rocketmail.com (koresponden)**Retno Sasongkowati**Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; retnosasongkowati123@gmail.com**Lully Hanny Endarini**Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; lullyhannyendarini@gmail.com**Anita Dwi Anggraini**Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; anita.anggraini40@yahoo.com**ABSTRACT**

Diabetes mellitus is a degenerative disease that has many complications, one of which is diabetic ulcers. People with diabetes mellitus who have open wounds will be more susceptible to infection because an increase in blood sugar can make the wound a nutrient and a place for bacterial growth. One of the bacteria that causes infection in open wounds is Staphylococcus aureus. Toxins released by Staphylococcus aureus can cause Staphylococcal Scaled Skin (SSS). This quantitative descriptive study was conducted at the Diabetes Wound Specialist House, involving patients with diabetes mellitus at the Diabetes Wound Specialist Hospital. Bacterial culture from patient wound swabs was carried out at the Microbiology Laboratory, Poltekkes Kemenkes Surabaya; while the detection of the Staphylococcus aureus EtA gene was carried out at the ITD (Institute of Tropical Diseases) Laboratory. Data were analyzed descriptively. The PCR results showed that from 30 samples of diabetes mellitus wound swabs, 2 samples were found positive for the presence of Staphylococcus aureus bacteria.

Keywords: *Exfoliative A gene; Staphylococcus aureus; diabetes mellitus*

ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit degeneratif yang punya banyak diikuti dengan komplikasi, salah satu di antaranya adalah ulkus diabetik. Penderita diabetes melitus yang memiliki luka terbuka akan lebih rentan mengalami infeksi karena adanya kenaikan gula darah dapat menjadikan luka tersebut menjadi nutrisi dan tempat pertumbuhan bakteri. Salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi pada luka terbuka adalah *Staphylococcus aureus*. Toksin yang dikeluarkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan *Staphylococcal Scaled Skin* (SSS). Penelitian deskriptif kuantitatif ini dilaksanakan di Rumah Spesialis Luka Diabetes, dengan melibatkan pasien diabetes mellitus di Rumat Spesialis Luka Diabetes. Kultur bakteri dari usap luka pasien dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Poltekkes Kemenkes Surabaya; sedangkan deteksi gen EtA bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium ITD (Institute of Tropical Diseases). Data dianalisis secara deskriptif. Hasil PCR menunjukkan bahwa dari 30 sampel usap luka diabetes melitus, telah ditemukan 2 sampel positif adanya bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: *gen Exfoliatif A; Staphylococcus aureus; diabetes mellitus*

PENDAHULUAN**Latar Belakang**

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram-positif yang diwarnai Gram dalam bentuk kokus dan digambarkan memiliki penampilan seperti anggur ⁽¹⁾. Di media, bakteri ini sering terlihat sebagai koloni emas atau kuning (Aureus berarti emas atau kuning) ⁽²⁾. Bakteri ini dapat tumbuh secara aerob atau anaerob (fakultatif) dan pada suhu antara 18°C dan 40°C ⁽³⁾. *Staphylococcus aureus* adalah flora bakteri normal pada kulit manusia dan selaput lendir ⁽⁴⁾. Jenis lain dapat menyebabkan nanah, pembentukan abses, berbagai infeksi bernanah, dan bahkan keracunan darah yang fatal. *Staphylococcus aureus* patogen dapat menyebabkan hemolisis darah, mengentalkan darah, dan menghasilkan berbagai enzim dan eksotoksin ⁽⁵⁾. *Staphylococcus aureus* biasanya tidak menyebabkan infeksi pada kulit yang sehat, tetapi ketika menyerang aliran darah atau jaringan internal, dapat menyebabkan berbagai infeksi yang berpotensi serius. Diperkirakan bahwa hingga setengah dari semua orang dewasa dan sekitar 15% dari populasi umum selalu membawa *Staphylococcus aureus* di nares anterior ⁽⁶⁾

Infeksi yang disebabkan oleh kemampuan suatu mikroorganisme patogenik tidak hanya dipengaruhi oleh sifat mikroba, tetapi juga dipengaruhi oleh kemampuan inang dalam menahan infeksi atau membentuk kekebalan⁽⁷⁾. Kemampuan mikroba dalam menyebabkan infeksi tersebut disebut virulensi, sedangkan komponen pada mikroba yang dapat meningkatkan patogenitas disebut faktor virulensi. Faktor virulensi yang potensial banyak dimiliki oleh *Staphylococcus aureus*⁽⁸⁾. Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit degeneratif dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya⁽⁹⁾. Pasien yang memiliki penyakit diabetes melitus dan memiliki luka terbuka akan lebih rentan mengalami infeksi pada lukanya karena pasien diabetes melitus mempunyai daya tahan tubuh yang lemah dan adanya gula darah yang tinggi sebagai nutrisi dan tempat pertumbuhannya bakteri⁽¹⁰⁾. Faktor virulensi *Staphylococcus aureus* terdiri atas antigen (capsule dan adhesins), enzim (coagulase, lipase, hyaluronidase, staphylokinase, dan nuclease), serta sebanyak 7 toksin yaitu α -toksin, β -toksin, δ -toksin, PV Leukocidin, enterotoksin, exfoliatif toksin, dan toxic shock syndrome toxin (TSST)⁽¹¹⁾. *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri berbahaya, karena mampu memproduksi racun yang disebut enterotoksin. Masa inkubasi racun adalah 18 jam. Gejala keracunan antara lain sakit perut, muntah, dan diare⁽¹²⁾. Keracunan yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai keracunan, asupan makanan enterotoksin yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*⁽¹³⁾. Enterotoksin stafilocokus dapat menyebabkan keracunan bahkan pada dosis yang sangat rendah, yaitu 0,5 ng/ml⁽¹⁴⁾. Toksin ini adalah toksin epidermis yang terdiri dari dua protein berbeda dengan berat molekul yang sama: epidermis A dan epidermis B⁽¹⁵⁾. Toksin ini memiliki aktivitas proteolitik dan dapat melisis mukopolisakarida epidermal, menyebabkan deskuamasi intraepitel dari sambungan sel di stratum granulosum. Toksin ini menyebabkan kulit bersisik staphylococcal (SSS), yang ditandai dengan lepuh pada kulit. Oleh karena itu, penting dilakukan penelitian untuk menganalisis dan mengkaraktirisasi gen exfoliating A (EtA) dari *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari luka diabetes. Antibiotik adalah pengobatan utama untuk penyakit menular, tetapi jika antibiotik tidak digunakan dengan benar, bakteri menjadi kebal terhadapnya, mengurangi kegunaannya. Infeksi bakteri resisten antibiotik meningkatkan risiko morbiditas dan mortalitas⁽¹⁶⁾. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya gen EtA pada bakteri *Staphylococcus aureus* pada isolat swab luka diabetes mellitus.

METODE

Jenis penelitian ini adalah deskriptif kuantitatif dengan metode analisis data observasi sampel swab luka diabetes mellitus di Rumat Spesialis Luka Diabetes. Populasi dari penelitian ini adalah pasien diabetes mellitus di Rumat Spesialis Luka Diabetes. Sampel dari penelitian ini adalah swab luka pada pasien diabetes mellitus berusia mulai 40-60 tahun di Rumat Spesialis Luka Diabetes. Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2021 sampai bulan Desember 2021. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Surabaya untuk dilakukan kultur bakteri dari usap luka pasien diabetes mellitus; di Laboratorium ITD (Institute Of Tropical Diseases) untuk dilakukan deteksi gen EtA pada bakteri *Staphylococcus aureus*; dan pengumpulan sampel dilakukan di Rumat Spesialis Luka Diabetes cabang Surabaya dan Sidoarjo.

Penelitian ini sudah mendapatkan keterangan layak etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya dengan No. EA/692/KEPKPoltekkes_Sby/V/2021.

Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel swab luka diabetes mellitus ditanam pada media BAP kemudian diinkubasi selama 24jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob. Profil koloni dan reaksi hemolisis diamati setelah 24jam. Koloni yang memiliki reaksi β hemolisis terbesar kemudian ditanam pada media MSA untuk melihat kemampuan bakteri memecah manitol dan NAS untuk melihat pigmen yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil biakan pada media MSA dan NAS dilihat kemurniannya dan dilakukan perwarnaan gram dan tes koagulase serta tes katalase untuk memastikan bakteri tersebut.

Identifikasi Gen EtA

Pada prosedur amplifikasi gen *mecA*, primer yang digunakan adalah forward primer F CTAGTGCATTTGTTATTCAA R TGCATTGACACCATAGTACT dengan pembacaan 119 bp. Kondisi PCR yang digunakan untuk identifikasi adalah tahap pra-denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C. Denaturasi pada 94°C selama 1 menit, penempelan pada 52 ° C selama 30 detik, pemanjangan pada 72 ° C selama 1 menit, mempertahankan 30 siklus. Akhir pemanjangan pada suhu 72°C selama 5 menit dan reaksi pada suhu 4°C. Hasil produk amplifikasi dibaca pada gel agarosa 2%.

Visualisasi dengan Elektroforesis

Produk PCR divisualisasikan pada gel agarosa 2%. Ke dalam 0,4 gram serbuk agarosa, ditambahkan 20 ml larutan 0,5xTAE (sebagai buffer) dan dilarutkan dengan cara dipanaskan dan diaduk hingga merata. Keluarkan larutan agarosa, dididihkan, dan tuangkan ke dalam sumur elektroforesis. Ada larutan elektroforesis dipasang sisir sumuran dan didiamkan hingga mengeras. Apabila agarose gel telah mengeras, sisir sumuran bisa diambil. Pada sumuran elektroforesis ditambahkan juga larutan TAE 0,5x. Masukkan hasil PCR kedalam sumuran tersebut dengan cara dipipet. Sebagai penanda ukuran pita DNA, diambil 1 µl marker (DNA Ladder 100-bp) di atas parafilm, dilakukan pada voltase 100 selama 1 jam sampai indikator bromphenol blue dan loading buffer bermigrasi mencapai bagian dasar gel. Setelah itu agarose gel diangkat dan direndam dalam larutan pewarna Ethidium Bromida dan diinkubasi di tempat gelap selama 10 menit kemudian di homogenkan pada shaker. Agarose gel kemudian dicuci dengan air yang mengalir dan diamati di bawah lampu UV Transilluminator pada Panjang 360 nm dan diamati pita DNA nya.

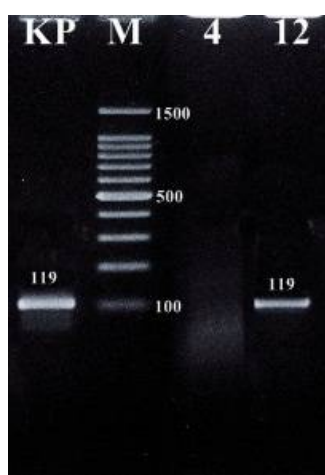
Teknik Analisis Data

Teknik analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Identifikasi isolate bakteri swab luka diabetes mellitus dilakukan secara konvensional dengan membandingkan karakter sampel dengan bakteri *Staphylococcus aureus* yang mengacu pada Bergey's Manual of Systemic Bacteriology Volume 3
2. Identifikasi panjang pita DNA dilakukan dengan menggunakan uji regresi linier. Panjang masing-masing pita DNA dalam gel dari setiap sampel isolat bakteri dari swab luka diabetik mengukur mobilitas listrik pita DNA dalam gel berdasarkan kurva standar panjang pembaca DNA (marker) 100 bp. Diputuskan dengan melakukan . Penanda DNA (Promega) dengan panjang DNA yang diketahui dielektroforesis dengan DNA dari isolat bakteri dari spesimen usap dari luka diabetes. Kurva standar untuk panjang penanda DNA dibuat oleh persamaan regresi linier dari hubungan antara Rf (sumbu X) dan logaritma penanda DNA (sumbu Y), dan mobilitas Rf (koefisien retensi) dari masing-masing sampel dihitung. Dengan membandingkan jarak pergerakan pita DNA dari situs awal dan jarak pergerakan pelacak warna dari situs awal

HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai Identifikasi Analisis Dan Karakterisasi Gen Exfoliatif A (Eta) Pada Bakteri *Staphylococcus Aureus* Isolat Luka Penderita Diabetes Melitus didapatkan hasil hasil biakan dan identifikasi dari 30 sampel swab luka diabetes mellitus dan ditemukan 2 sampel positif adanya bakteri *Staphylococcus aureus* dan 28 sampel tidak terdapat bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 1. Hasil deteksi Gen Exfoliatif A pada *Staphylococcus aureus* yang keluar pada 119 bp.

Setelah dilakukan biakan dan identifikasi bakteri kemudian dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu deteksi Gen Exfoliatif A dengan menggunakan metode PCR dan didapatkan data hasil PCR seperti pada gambar 1.

PEMBAHASAN

Hasil PCR menunjukkan dari 2 sampel yang positif terdapat 1 sampel pada kode 12 yang positif gen exfoliatif A yang keluar pada 119 bp. Toksin ini merupakan toksin epidermologi yang terdiri dari 2 protein yang berbeda dengan berat molekulnya yang sama yaitu epidermiologi A dan epidermiologi B⁽¹⁷⁾. Toksin ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan mukopolisakarida epidermis, sehingga dapat menyebabkan pemisahan intraepithelial pada ikatan sel di stratum granulosum⁽¹⁸⁾. Toksin ini menyebabkan Staphylococcal Scaled Skin (SSS), yang ditandai dengan melepuhnya kulit, sehingga penting untuk dilakukan penelitian analisis dan karakterisasi gen exfoliatif A (EtA) pada bakteri staphylococcus aureus isolat luka penderita diabetes melitus⁽¹⁹⁾.

Penyebab infeksi luka pada DM adalah merupakan gabungan antara bakteri aerob dan anaerob. Salmonella sp 82,15%, Pseudomonas sp 17,86%, Staphylococcus aureus 17,85%, dan Enterobacter sp 10,17% yaitu bakteri aerob dan anaerob yang terdapat kultur pus pada penderita diabetes⁽²⁰⁾. Hal ini senada dengan hasil penelitian ini yang menyatakan infeksi S.aureus tidak terlalu banyak ikut serta dalam menginfeksi luka pada penderita DM yang didapatkan dari 30 sampel swab luka penderita DM hanya terdapat 2 sampel (6,6%) yang positif S.aureus. Di Eropa, USA, dan Afrika lebih sering ditemukan, bahkan diekspresikan oleh lebih dari 80% strain S. aureus yang menghasilkan toksin⁽²¹⁾. Hanya di negara Jepang strain S. aureus lebih umum menghasilkan dan mengekspresikan etb dibandingkan dengan etA⁽²²⁾. Toksin Eksfoliatif ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan matriks mukopolisakarida epidermis, sehingga menyebabkan pemisahan intraepithelial pada ikatan sel di stratum granulosum. Toksin eksfoliatif merupakan penyebab Staphylococcal Scalded Skin Syndrome.⁽²³⁾

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa dari 2 sampel terdapat 1 sampel yang positif gen exfoliatif A, yang menunjukkan bahwa 1 isolat yang mampu mempunyai gen exfoliatif A. Saran dari penelitian ini adalah setelah didapatkan gen exfoliatif A selanjutnya dapat dilakukan analisis genome dari gen exfoliatif A untuk mengetahui susunan genome dari gen exfoliatif A

DAFTAR PUSTAKA

1. Amalia Krishna Dewi. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas Staphylococcus aureus terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. SAIN Vet. 2013;31(2):138–50.
2. Syafriana V, Hamida F, Damayanti R, ... Aktivitas antibakteri ekstrak biji anggur (Vitis vinifera L.) terhadap Streptococcus pyogenes. Sainstech [Internet]. 2020;40–4. Available from: <https://ejournal.istn.ac.id/index.php/saintechfarma/article/view/523>
3. Amelia R, Burhanuddin N. Identifikasi Bakteri Staphylococcus Aureus Dengan Infeksi Nosokomial Pada Sprei Di Ruang Perawatan Pascabedah RSUD Labuang Baji Kota Makassar. J Public Heal. 2018;1(9–10):272–8.
4. Karimela EJ, Ijong FG, Dien HA. Characteristics of Staphylococcus aureus Isolated Smoked Fish Pinekuhe from Traditionally Processed from Sangihe District. J Pengolah Has Perikan Indones. 2017;20(1):188.
5. Purnomo A, Hartatik, Salasia SIO, Soegiyono. Isolasi dan Karakterisasi Staphylococcus aureus Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa. Media Kedokt Hewan. 2006;22(3):142–7.
6. Jayanthi AAI, Tarini NM adi, Praharsini IGAA. Staphylococcus aureus sebagai agen penyebab infeksi pada kasus erisipelas kruris dekstra dengan liken simpleks kronikus. Intisari Sains Medis. 2020;11(3):1482–91.
7. Pratiwi RH. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. J Pro-Life. 2017;4(2):418–29.
8. Larasati SA, Windria S, Cahyadi AI. Virulence Factorsofstaphylococcus Aureus Which Play an Important Rolein the Occurrence of Mastitis in Dairy Cattle: a Literature Review. Indones Med Veterinus. 2020;9(6):984–99.
9. Rahmasari. Efektivitas momordica carantia (pare) terhadap penurunan kadar glukosa darah. J Ilm Rekam Medis dan Inform Kesehat. 2019;9(1):57–64.
10. Fitria E, Nur A, Marissa N, Ramadhan N. Karakteristik Ulkus Diabetikum pada Penderita Diabetes Mellitus di RSUD dr. Zainal Abidin dan RSUD Meuraxa Banda Aceh. Bul Penelit Kesehat. 2017;45(3):153–60.
11. Prasetyo B. Identifikasi Gen Enterotoksin Dan Exfoliatif Isolat Staphylococcus aureus Asal Susu Sapi Perah Dan Susu Kambing Dari Bogor. J Mat Saint dan Teknol. 2015;16(2):100–13.
12. Pinchuk I V., Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. Toxins (Basel). 2010;2(8):2177–97.

13. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins* (Basel). 2010;2(7):1751–73.
14. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
15. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):224–42.
16. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *Toxins* (Basel). 2010;2(5):1148–65.
17. Mattoo S, Cherry JD. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to. *Society*. 2005;18(2):326–82.
18. Mauldin, E.A., Peters-kennedy J. CHAPTER 6 Integumentary System. *Dermahistopathology* [Internet]. 2020;1(January):509-736.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5317-7.00006-0>
19. Choi JH, Lee H, Choi EH. Antimicrobial Resistance and Molecular Analysis of Staphylococcus aureus in Staphylococcal Scalded Skin Syndrome among Children in Korea. *J Korean Med Sci*. 2021;36(2):1–9.
20. Banu A, Noorul Hassan MM, Rajkumar J, Srinivasa S. Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. *Australas Med J*. 2015;8(9):280–5.
21. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
22. Mohseni M, Rafiei F, Ghaemi EA. High frequency of exfoliative toxin genes among staphylococcus aureus isolated from clinical specimens in the north of Iran: Alarm for the health of individuals under risk. *Iran J Microbiol*. 2018;10(3):158–65.
23. Ladhani S, Poston SM, Joannou CL, Evans RW. Staphylococcal scalded skin syndrome: Exfoliative toxin A (ETA) induces serine protease activity when combined with A431 cells. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 1999;88(7):776–9.