

Deteksi Mekanisme Efflux Pump Pada Resistensi Bakteri *Staphylococcus haemolyticus*, Sampel Pus Klinis Rumah Sakit Pekanbaru

Rexi Dwi Wardana¹, Maya Savira², Dewi Anggraini², Aisyah Sabrina Amalia¹, Yuana Nurulita^{1*}

¹Bidang Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Kampus Bina Widya KM. 12,5, Simpang Baru, Kec. Tampan, Kota Pekanbaru, Riau, 28293, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Riau, Jl. Diponegoro No.1, Suka Mulia, Kec. Sail, Kota Pekanbaru, Riau 28133, Indonesia

*Penulis korespondensi: ynurulita@lecturer.unri.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v12.n3.52038>

Abstrak: Infeksi adalah masalah kesehatan yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri. Salah satu jenis infeksi yaitu infeksi kulit dan jaringan lunak yang umumnya disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dan menyebabkan pembentukan pus. Saat ini, telah dilaporkan bahwa kasus spesies CoNS (*Coagulase Negative Staphylococcus*) seperti *Staphylococcus haemolyticus* sebagai penyebab infeksi, mengalami peningkatan. Selain itu, spesies ini juga diketahui telah mengalami resistensi terhadap beberapa golongan antibiotik. Dalam penelitian ini dilakukan karakterisasi isolat bakteri klinis dari sampel pus agar yang dilakukan dengan identifikasi mikrobiologi (kultur isolat, pewarnaan Gram dan uji biokimia) pada bakteri patogen (Isolat 3887), dan dilanjutkan dengan identifikasi molekuler, antara lain ekstraksi DNA kromosom dan plasmid, amplifikasi gen 16S rRNA, sekuensing dan analisis bioinformatik menggunakan BioEdit, BLAST dan filogenetika. Uji suseptibilitas terhadap 25 jenis antibiotik dan deteksi gen resisten clindamycin (*ermA*, *ermB*, *ermC* dan *msrA*) dan cefazolin (*blaTEM-1*, *blaSHV* dan *blaOXA-1*) dilakukan untuk mengidentifikasi kemungkinan mekanisme resistensi bakteri patogen. Berdasarkan hasil identifikasi mikrobiologi dan molekuler, isolat 3887 merupakan CoNS dengan strain *Staphylococcus haemolyticus*. Isolat 3887 resisten terhadap 12 dari 25 antibiotik yang diuji dan memiliki fenotipe resisten tertinggi terhadap clindamycin dan cefazolin. Hasil uji deteksi gen resisten clindamycin dan cefazolin menunjukkan hanya gen *msrA* yang terdeteksi baik pada kromosom dan plasmid isolat 3887 yang menunjukkan bahwa mekanisme resistensi melalui *efflux pump*.

Kata kunci: cefazolin, clindamycin, identifikasi, infeksi, *S. haemolyticus*

Abstract: Infections are caused by pathogenic microorganisms such as bacteria. One type of infection is skin and soft tissue infection which is commonly caused by *Staphylococcus aureus* and causes pus formation. However, it has been reported that cases of CoNS (*Coagulase Negative Staphylococcus*) species such as *Staphylococcus haemolyticus* as the cause of these infections have increased. In addition, these species have also developed resistance to several classes of antibiotics. Therefore, this study characterised clinical bacterial isolates from pus agar samples. In this study, the identification of pathogenic bacteria (Isolate 3887) was carried out by microbiological identification (isolate culture, Gram staining and biochemical tests) and continued with molecular identification (chromosomal and plasmid DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, sequencing and bioinformatic analysis using BioEdit, BLAST and phylogenetics). Susceptibility testing against 25 types of antibiotics and detection of clindamycin (*ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA*) and cefazolin (*blaTEM-1*, *blaSHV* and *blaOXA-1*) resistant genes were performed to identify possible resistance mechanisms of pathogenic bacteria. Based on the microbiological identification results, isolate 3887 was a CoNS with molecular identification of a *Staphylococcus haemolyticus* strain. Isolate 3887 was resistant to 12 of the 25 antibiotics tested and had the highest resistant phenotype to clindamycin and cefazolin. The results of the clindamycin and cefazolin resistant gene detection test showed that only the *msrA* gene was detected in both the chromosome and plasmid of isolate 3887, indicating that the mechanism of resistance is through the *efflux pump*.

Keywords: cefazolin, clindamycin, identification, infection, *S. haemolyticus*

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh masuk dan berkembang biaknya mikroorganisme patogen seperti bakteri, fungi, parasit serta virus (Novard *et al.* 2019). Salah satu jenis infeksi yang sering terjadi di Indonesia yaitu infeksi kulit dan jaringan lunak disebabkan oleh patogen pada saat atau setelah trauma, luka bakar maupun setelah operasi yang mengakibatkan pembentukan pus (Trojan *et al.* 2016). Pada umumnya, infeksi kulit dan jaringan lunak disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* bukan oleh CoNS (*Coagulase Negative Staphylococcus*) yang hanya dianggap sebagai bakteri komensal pada kulit yang tidak berbahaya. Saat ini, telah dilaporkan bahwa adanya peningkatan CoNS seperti *Staphylococcus haemolyticus* sebagai penyebab infeksi kulit dan jaringan lunak dimana diakibatkan oleh meningkatnya pemakaian alat prostetik dan teknologi invasif dalam dunia medis (Shittu *et al.* 2004).

Terapi terhadap penyakit infeksi biasanya diatasi menggunakan antibiotik (Simaremare *et al.* 2020). Namun, penggunaan antibiotik yang tidak rasional maupun berlebihan dapat menimbulkan resistensi antibiotik terhadap bakteri patogen. Resistensi antibiotik adalah kemampuan bakteri yang sebelumnya sensitif terhadap kerja antibiotik menjadi kebal dan antibiotik tidak dapat bekerja efektif. Resistensi antibiotik disebabkan oleh adanya gen resistensi antibiotik yang mengkode sifat-sifat resistensi. Gen resistensi antibiotik ini dapat diperoleh melalui mutasi genetik ataupun transfer gen (Amarasiri *et al.* 2020). Resistensi antibiotik dapat menyebabkan hasil terapi pasien menjadi tidak akurat bahkan berimplikasi pada mahalanya biaya pengobatan (Wulandari *et al.* 2021).

Pada kasus bakteri *S. haemolyticus*, spesies ini dilaporkan umumnya sudah resisten terhadap antibiotik methicillin/oxacillin. Selain itu, berbagai penelitian dunia melaporkan bahwa *S. haemolyticus* juga dilaporkan sudah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik seperti penicillin, tetracycline, aminoglycoside, cephalosporin, quinolone, macrolide dan glycopeptide (Alahmadi *et al.* 2021). Oleh karena itu, studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat klinis dari sampel pus rumah sakit dengan metode analisis mikrobiologi dan biologi molekuler.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (ALP), inkubator (memmert), mikroskop cahaya (LEICA DM 500), *Molecular Imager Gel DocTM EZ* (BIO-RAD), slide kaca mikroskop, *vortex mixer*, *mini centrifuge* (DLAB D1008), *mini spin plus centrifuge* (Eppendorf), *biological safety cabinet*, *microwave* (Panasonic), neraca analitik (PioneerTM), *PCR tubes* (PCR-02D-C, Axygen), *UV*

sample tray (No. Katalog 1708271, BIO-RAD) dan alat-alat standar laboratorium lain sesuai prosedur kerja.

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri pasien rumah sakit (dengan kode 3887), *blood agar base* (Oxoid), Mueller-Hinton agar (Merck, Germany). Cakram antibiotik (Oxoid, UK) yang dapat dilihat pada Tabel 4, aquades steril, 1 set pewarna Gram (Indo Reagen), *immersion oil* (Merck), 2x My taq red mix, *loading dye*, GelRed® Nucleic Acid Stain 10,000X in water (No.Katalog 41003, Biotium), bubuk agarosa, buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1x, marker 1 kb DNA ladder (Tiangen), marker 100 bp DNA ladder (Tiangen), primer 41F (5'-GCT-CAG-ATT-GAA-CGC-TGG-CG-3') dan primer 1066R (5'-ACA-TTT-CAC-AAC-ACG-AGC-TG-3'), primer gen resisten clindamycin (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*) dan primer gen resisten cefazolin (*blaSHV*, *blaTEM-1*, *blaOXA-1*).

Peremajaan Isolat

Isolat bakteri 3887 diinokulasi pada *blood agar* dengan teknik penggoresan. Isolat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pewarnaan Gram

Isolat diinokulasi pada slide kaca dan dilakukan fiksasi dengan menggunakan spiritus. Reagen gentian violet ditetesi sebanyak 2-3 tetes pada isolat dan didiamkan selama 1-2 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Reagen lugol dan reagen fuchsin ditetesi pada isolat dan diperlakukan dengan cara yang sama seperti reagen gentian violet. Slide kaca ditempatkan pada mikroskop lensa okuler dan ditetesi dengan 2-3 tetes *immersion oil*. Lensa mikroskop diatur sedemikian rupa hingga morfologi bakteri terlihat dengan jelas.

Uji Biokimia

Uji Katalase

Isolat diinokulasi ke slide kaca mikroskop dan ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 tetes.

Uji koagulase

Isolat diinokulasi ke slide kaca mikroskop dan ditetesi dengan reagen koagulase sebanyak 1-2 tetes.

Uji Sensitivitas Antibiotik

Penentuan resistensi antibiotik secara fenotipe dilakukan dengan metode Kirby-Bauer dengan mengikuti standar dari Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2020). Media yang digunakan yaitu Mueller-Hinton agar (Merck, Germany). Cakram antibiotik (Oxoid, UK) yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2. Isolat bakteri diinokulasi ke dalam air steril dan kekeruhannya disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5. Suspensi isolat sebanyak 500 µl disebar ke permukaan agar. Cakram antibiotik diletakkan di atas agar. Media diinkubasi dengan cara

dibalikkan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dan hasilnya diinterpretasi berdasarkan standar dari CLSI.

Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA genom bakteri dilakukan dengan metode enzimatis mengikuti prosedur dari TIANamp bacteria DNA kit. Ekstrak genom sebanyak 5 µL dicampurkan dengan 1 µL loading dye. Campuran ditempatkan pada gel agarosa 1% (0,4 gram agarosa dalam 40 mL buffer TAE 1X). DNA ladder 1 kb ditambahkan sebanyak 3 µL untuk mengkonfirmasi ukuran DNA. Elektroforesis dijalankan pada buffer TAE pada tegangan 75 volt, dan divisualisasi dengan sinar UV.

Isolasi DNA plasmid bakteri dilakukan dengan metode enzimatis mengikuti prosedur dari DNA-Spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON, Korea Selatan). Optimasi elektroforesis plasmid sama dengan genom, tetapi dilakukan dengan gel agarosa 2% (0,8 gram dalam 80 mL buffer TAE 1X).

Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

Amplifikasi dilakukan dalam volume total 25 µL terdiri dari primer forward dan reverse masing-masing 0,5 µL, ddH₂O 11,2 µL, template genom 0,3 µL dan My taq red mix 12,5 µL. Reaksi diawali dengan hot start pada suhu 96°C selama 1 menit dan dilanjutkan 30 siklus. Setiap siklus PCR terdiri proses denaturasi pada suhu 96°C selama 15 detik, proses *annealing* (penempelan) pada suhu 55°C selama 60 detik, dan proses *extension* (pemanjangan) pada suhu 72°C selama 90 detik serta ekstensi akhir 72°C selama 3 menit. Hasil PCR dideteksi dengan elektroforesis pada tegangan 75 volt.

Sekuensing DNA dan Analisis Filogenetik

Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel ke First Base – Genetika Science. Hasil sekuensing berupa elektroforegram yang masih perlu diverifikasi menggunakan *software* BioEdit. Sekuens yang diperoleh dianalisis menggunakan BLAST yang diakses melalui website www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA antara sampel dan sekuens yang ada di GenBank. Pada penelitian ini terdapat 2 pendekatan dalam analisis BLAST. Pertama, sekuens hasil analisis BLAST dipilih spesies yang memiliki riwayat resistensi antibiotik dan sampel klinis. Pendekatan kedua yaitu dengan memilih 10 sekuens dengan nilai *percent identity* tertinggi.

Hasil analisis BLAST kemudian dilakukan *Multiple Sequences Alignment* menggunakan *software* ClustalW untuk menentukan jarak kedekatan masing-masing sekuens yang sudah disejajarkan. Selanjutnya, pohon filogenetik dikonstruksi dengan program MEGA X. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan metode *Neighbour Joining Tree* menggunakan model *Maximum Composite Likelihood* dengan *bootstrap* 1000.

Deteksi Gen Resistensi Antibiotik

Deteksi gen resistensi antibiotik dilakukan dengan metode PCR baik pada genom maupun plasmid. Sekuens primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1 yang disesuaikan dengan hasil uji sensitifitas antibiotik tertinggi (resistensi tertinggi). Amplifikasi dilakukan dalam volume total 29 µL (31 µL untuk plasmid) terdiri dari primer forward dan reverse masing-masing 1 µL, ddH₂O 12,5 µL, template 2 µL

Tabel 1. Primer gen resisten clindamycin dan cefazolin

Gen	Sekuens	Suhu annealing (°C)	Amplikon (bp)
<i>ermA</i>	F:TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT	54°C	139
	R:CTACACTTGGCTTAGGATGAAA		
<i>ermB</i>	F:CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	54°C	142
	R:GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA		
<i>ermC</i>	F:AATCGTCAATTCCTGCATGT	54°C	299
	R:TAATCGTGGAATACGGGTTTG		
<i>msrA</i>	F:TCCAATCATTGCACAAAATC	52°C	162
	R:CAATCCCTCTATTTGGTGGT		
<i>blaSHV</i>	F:AGGATTGACTGCCTTTTTTG	54°C	392
	R:ATTTGCTGATTTTCGCTCG		
<i>blaTEM-1</i>	F:TTCTTGAAGACGAAAGGGC	54°C	1190
	R:ATGGTGAGTGGAACGAAAAC		
<i>blaOXA-1</i>	F:ATATCTCTACTGTTGCATCTCC	54°C	619
	R:AAACCCTTCAAACCATCC		

(4 µL untuk plasmid) dan My taq red mix 12,5 µL.

Deteksi gen resisten clindamycin yaitu *ermA*, *ermB*, *ermC* dan *msrA* (Mazloumi *et al.* 2021), reaksi diawali dengan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit (5 menit untuk *msrA*) dan dilanjutkan dengan 35 siklus. Setiap siklus PCR terdiri proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 60 detik (52°C untuk *msrA*), dan proses ekstensi pada suhu 72°C selama 45 detik. Tahap ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit.

Deteksi gen resisten cefazolin *blaTEM-1* (Delmani *et al.* 2017), *blaSHV* dan *blaOXA-1* (Gharajalar & Onori 2019) diawali dengan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit dan dilanjutkan dengan 32 siklus. Setiap siklus PCR terdiri proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik, dan proses ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit. Produk amplifikasi masing-masing gen resisten dilakukan elektroforesis dengan gel agarosa 1% pada tegangan 75 volt. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan bantuan sinar UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri dengan kode 3887 merupakan isolat bakteri koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Riau yang diisolasi dari spesimen tubuh pasien yakni pus. Riwayat pasien dan isolat diyakini sudah terpapar oleh berbagai macam antibiotik yang disebabkan oleh infeksi terus menerus dan pemberian antibiotik yang tidak rasional dan taat asas. Hal ini memungkinkan bahwa isolat ini bersifat resisten terhadap beberapa antibiotik sehingga perlu dilakukan pemeriksaan di laboratorium untuk mendapatkan data yang digunakan untuk pengobatan pada pasien.

Penelitian dimulai dengan peremajaan isolat pada *Blood Agar* (BA). Media BA merupakan media yang

umumnya digunakan untuk menumbuhkan patogen yg sukar tumbuh dan mikroorganisme lainnya. Media BA dibuat dengan mencampurkan agar dengan darah sekitar 5-10% (Jadubansa & Sabin 2009; Novita & Febrianti 2019). Isolat ditumbuhkan pada suhu 37°C yang merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri. Hasil peremajaan pada Gambar 1. menunjukkan bahwa isolat 3887 memiliki bentuk koloni bulat berwarna putih dengan permukaan koloni opaque. Hasil ini serupa dengan penelitian dari (Novita & Febrianti 2019) yang menyatakan isolat tumbuh berwarna putih abu-abu pada media BA dengan konsentrasi darah 6-8%.

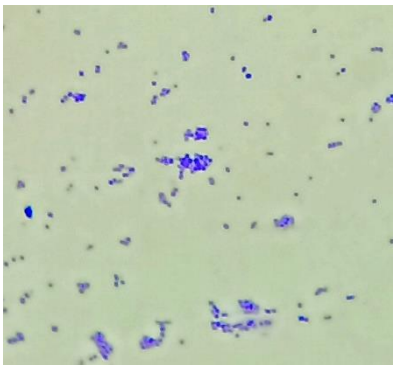
Pewarnaan Gram digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dan membedakannya menjadi dua kelompok besar, yakni Gram positif dan Gram negatif yang berdasarkan pada sifat fisik dan kimia dinding sel bakteri (Yusmaniar *et al.* 2017). Hasil pewarnaan Gram pada Tabel 2 menunjukkan bahwa isolat 3887 merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk sel kokus. Hal ini dapat dilihat diamati dari hasil pewarnaan Gram sel bakteri yang berwarna ungu dikarenakan memiliki peptidoglikan yang tebal. Alhasil, pewarna kristal violet tidak larut disaat dicuci dengan etanol (Wulandari & Purwaningsih 2019).

Uji biokimia merupakan metode klasifikasi bakteri berdasarkan sifat fisiologisnya. Pada penelitian ini, uji biokimia merujuk pada hasil pewarnaan Gram. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat 3887 merupakan kokus Gram positif. Oleh karena itu, isolat ini dilakukan uji katalase. Uji katalase berguna untuk membedakan *Staphylococci* dan *Streptococci* dimana *Staphylococci* menghasilkan enzim katalase (positif) sedangkan *Streptococci* tidak (negatif) (Cheesbrough 2006). Berdasarkan hasil analisis morfologi dan uji biokimia (Tabel 2), dapat disimpulkan bahwa isolat 3887 merupakan jenis bakteri *Coagulase Negative Staphylococcus* (CoNS).



Gambar 1. Hasil peremajaan isolat 3887 pada media *blood agar*

Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram dan uji biokimia isolat 3887

Nama Uji	Hasil	Kesimpulan
Pewarnaan Gram		Kokus, Gram positif
Uji Katalase	(+) katalase	(+) <i>Staphylococcus</i> (-) <i>Streptococcus</i>
Uji Koagulase	(-) koagulase	(+) <i>S. aureus</i> (-) <i>Coagulase Negative Staphylococcus</i> (CoNS)

CoNS adalah bakteri komensal kulit. Selain peran mereka dalam mempertahankan homeostasis, CoNS telah diyakini muncul sebagai patogen utama dalam pengaturan nosokomial. Beberapa penelitian dengan pendekatan molekuler telah mengidentifikasi beberapa dugaan faktor virulensi yang berkaitan dengan patogenisitas *Staphylococcus* khususnya *S. aureus* (Argemi *et al.* 2019; Michels *et al.* 2021). Insiden CoNS terus meningkat selama beberapa dekade terakhir seiring dengan kemajuan dalam dunia kedokteran, terutama dalam hal implant perangkat medis dalam tubuh. Pasien dengan imunodefisiensi dan komorbiditas lain yang relevan, menyebabkan kasus-kasus kontaminasi CoNS. Oleh karena itu infeksi yang disebabkan oleh CoNS memerlukan penggunaan obat antibiotik generasi kedua (Michels *et al.* 2021).

Dalam tahun-tahun terakhir, sekuens genom CoNS telah banyak dipublikasikan dan mengarah pada identifikasi dugaan faktor virulensi. Awalnya postulat Koch dan penafsiran molekuler dari postulat ini oleh Stanley Falkow pada tahun 1988, tidak menjelaskan patogenisitas mikroba CoNS. Akan tetapi, seluruh genom data sekuens genom utuh telah memberikan informasi baru pada patogenisitas CoNS. Hal ini menjadi menunjukkan pentingnya analisis lanjut spesimen pus dari pasien untuk diteliti. Penelitian dilanjutkan dengan pendekatan biologi molekuler (genomik) yang diyakini dapat berkontribusi dalam mendefinisikan virulensi CoNS, dengan fokus pada spesies CoNS yang paling sering ditemukan dan patogen seperti *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, dan *S. lugdunensis* (Argemi *et al.* 2019).

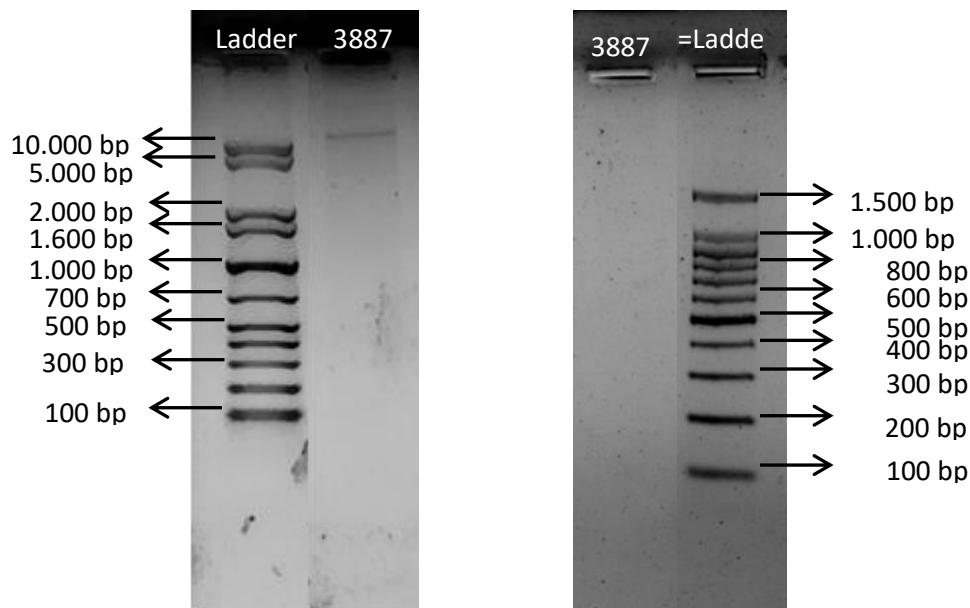
Isolasi DNA merupakan suatu teknik untuk memisahkan DNA dari makromolekul lain dari spesimen isolat seperti karbohidrat, lemak dan protein. DNA yang diisolasi dari Isolat 3887 yaitu DNA kromosom dan DNA plasmid. Hasil isolasi DNA kromosom dan DNA plasmid dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2, DNA kromosom isolat 3887 berhasil diisolasi. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya sebuah pita tunggal pada sumur isolat yang berukuran 10.000 bp. Pita yang terbentuk dari elektroforesis DNA kromosom tampak tipis yang mengindikasikan konsentrasi DNA tidak terlalu tinggi. Semakin tebal pita yang terbentuk, maka konsentrasi DNA semakin besar sedangkan semakin tipis pita yang terbentuk, maka konsentrasi DNA semakin kecil. Pada isolasi DNA plasmid isolat 3887, tidak terlihat terbentuknya pita pada rentang 1000 bp. Hal ini menandakan bahwa plasmid yang terekstraksi memiliki konsentrasi yang sangat sedikit sehingga pita tidak jelas terbentuk.

Penelitian dilanjutkan dengan identifikasi bakteri secara molekuler dengan cara mengamplifikasi gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA adalah gen pengkode rRNA dari prokariot yang memiliki bagian yang bersifat terkonservasi (*conserved*). Panjang urutan gen 16S rRNA adalah sekitar 1.550 bp (Noer 2021). Adapun beberapa kelebihan dari gen 16S rRNA yaitu fungsinya identik untuk setiap organisme, memiliki daerah *hyper variable*, serta kemiripan yang didapat antar spesies mencapai 99%. Selain itu, ukuran gen 16S rRNA yang standar cukup memudahkan dalam proses analisis tidak seperti gen 5S rRNA yang terlalu kecil dan gen 23S rRNA yang terlalu panjang (Akihary & Kolondam 2020).

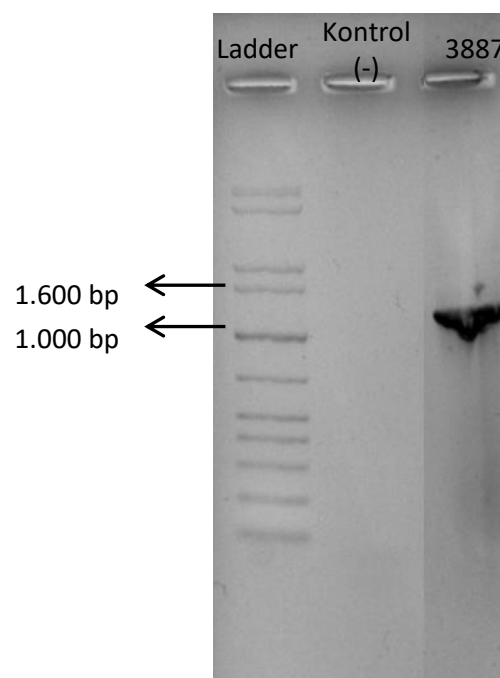
Analisis gen 16S rRNA dimulai dengan ekstraksi DNA kromosom. Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan PCR dengan bantuan primer 41F dan 1066R. Hasil PCR gen ini kemudian disekuensing untuk menentukan urutan basa nukleotidanya. Hasil sekuensing (Gambar 4) diproses menggunakan aplikasi BioEdit untuk memproses sekuens konsensus (Gambar 5) yang diperlukan untuk analisis BLAST. Berdasarkan Gambar 3, terbentuk pita DNA berukuran 1000 bp yang menandakan gen 16S rRNA berhasil diamplifikasi. Pita yang terbentuk cukup

tebal dimana hal ini menandakan jika gen 16S rRNA yang teramplifikasi memiliki konsentrasi yang tinggi.

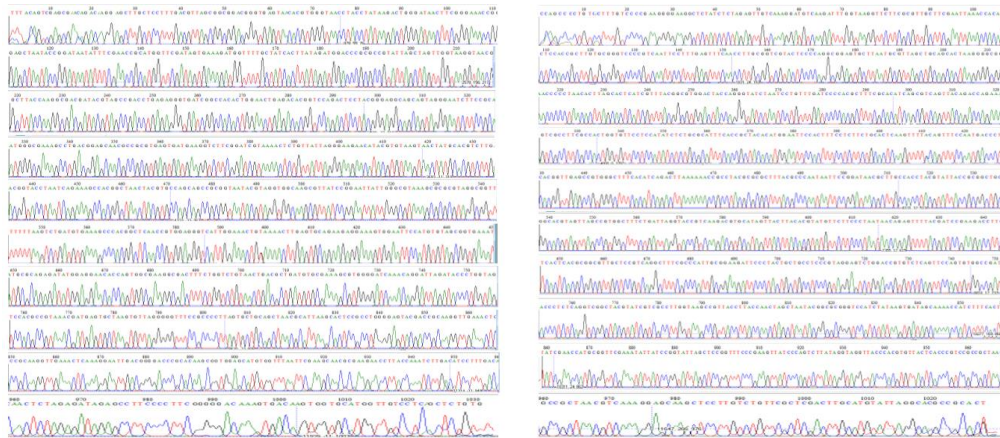
Analisis sekuens menggunakan *software* BLAST bertujuan untuk melihat tingkat homologi antara sekuens yang dianalisis dengan sekuens pada database mulai dari tingkat kemiripan tertinggi hingga terendah. Berdasarkan Tabel 3, isolat 3887 memiliki homologi tertinggi terhadap *Staphylococcus haemolyticus* dengan nilai *percent identity* 99,70% dengan nilai *query coverage* 100%. Menurut Reller *et al.* 2007, isolat yang memiliki homologi 99% pada



Gambar 2. Hasil isolasi DNA kromosom (kiri) dan DNA plasmid (kanan)



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat 3887



Gambar 4. Hasil sekuensing (elektroforegram) gen 16S rRNA isolat 3887 dengan primer 41F (kiri) dan primer 1066 R (kanan)

```

.....
CATGCAAGTC GAGCGAAGAC ACAAGAGCT TGCTCTTTTG ACCTTAGCG CGGACGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTA CCTAAGAC TGGGATAACT TCGGAAAC
5      15      25      35      45      55      65      75      85      95      105
115      125      135      145      155      165      175      185      195      205      215
GGAGCTAATA CCGGATAATA TTTCGAACCG CATGGTTCGA TAGTGAAGA TGGTTTGTCT ATCACTTATA GATGGACCG CGCGTATTA GCTAGTTGGT AAGGTAACGG
225      235      245      255      265      275      285      295      305      315      325
CTTACCAAGG CGACGATACG TAGCGACCT GAGAGGGTGA TCGGCCACAC TGGACCTGAG ACACGTGCGA GACTCTACG GGAAGGACCA GTAGGGAATC TTCCGCAATG
335      345      355      365      375      385      395      405      415      425      435
GGCGAAAGCC TGACGGAGCA ACGCCGGTG AGTGATGAG GTCTTCGGAT CGTAAACTC TGTATTAGG GAAGACATA CGTGAAGTA ACTATGACG TCTTGACGGT
445      455      465      475      485      495      505      515      525      535      545
ACCTAATCAG AAGGCCACGG CTAACACTCG GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTATCC GGAATTATTG GCGTAAGG GCGCGTAGGC GGTTTTAA
555      565      575      585      595      605      615      625      635      645      655
GTCTGATGTG AAGGCCACGG GCTCAACCTG GAGGGTCTAT TGGAACTGT AAACTTGAG TGCAGAGAG GAAAGTGAA TTCCATGTGT AGCGGTGAAA TCGCCAGAGA
665      675      685      695      705      715      725      735      745      755      765
TATGAGGAA CACCAAGTGC GAAGCGACT TTCTGGTCTG TAAGTGACG TGATGTGCGA AAGCGTGGGG ATCAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA
775      785      795      805      815      825      835      845      855      865      875
CGATGAGTGC TAAGTGTAG GGGGTTTCGG CCCCTTAGTG CTGACGCTAA CGCATTAGC ACTCCGCTCG GGGAGTAGCA CCGCAAGTTT GAACTCAA GGAATTGACG
885      895      905      915      925      935      945      955      965      975      985
GGGACCGCA CAGCGGGTG AGCATGTGT TTAATGGA GCAGCGGAA GAACCTTACC AATCTTGAC ATCTTTGAC AACTCTAGAG ATAGACCTT CCCCTTGGG
995      1005
GGACAAGTG ACAAGTGGT C

```

Gambar 5. Sekuens konsensus gen 16S rRNA isolat 3887 yang sudah diverifikasi melalui BioEdit

Tabel 3. Hasil analisis BLAST isolat 3887

No	Species	Strain	Kode Akses Gen Bank	Percent Identity (%)
1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	JCM 2416	NR_113345.1	99,70%
2	<i>Staphylococcus taiwanensis</i>	NTUH-S172	NR_181843.1	99,60%
3	<i>Staphylococcus borealis</i>	51-48	NR_181247.1	99,60%
4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SM 131	NR_036955.1	99,31%
5	<i>Staphylococcus caledonicus</i>	H8/1	NR_157729.1	99,21%
6	<i>Staphylococcus devriesei</i>	KS-SP 60	NR_116627.1	99,01%
7	<i>Staphylococcus pragensis</i>	CCM 8529	NR_136463.1	98,91%
8	<i>Staphylococcus croceilyticus</i>	MCC10046	NR_132590.1	98,81%
9	<i>Staphylococcus petrasii</i>	SEQ110	NR_118248.1	98,81%
10	<i>Staphylococcus petrasii</i>	CCM 8418	NR_118450.1	98,71%
11	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	CCM 8730	NR_156818.1	98,52%

analisis BLAST merupakan isolat dengan genus dan spesies yang sama.

Penelitian dilanjutkan ke tahap analisis filogenetik. Analisis filogenetik umumnya digunakan dalam mempelajari variasi genetik dan analisis

sistematika. Dalam mempelajari variasi genetik antar populasi, jarak genetik dapat diobservasi dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen tiap populasi berdasarkan urutan DNA. Analisis sistematika dilakukan melalui konstruksi sejarah

evolusi dan hubungan evolusi antara keturunan dengan nenek moyangnya berdasarkan pada kemiripan karakter sebagai dasar dari perbandingan (Mahfut 2020). Berdasarkan Gambar 6, isolat 3887 memiliki hubungan kekerabatan dengan *S. haemolyticus* dengan nilai *bootstrap* 91. Nilai *bootstrap* merupakan suatu parameter untuk menguji seberapa baik set data model yang digunakan (Dharmayanti 2011). Menurut Subari *et al.* 2021, pohon filogenetik yang tinggi dan baik adalah pohon filogenetik dengan nilai *bootstrap* diatas 70.

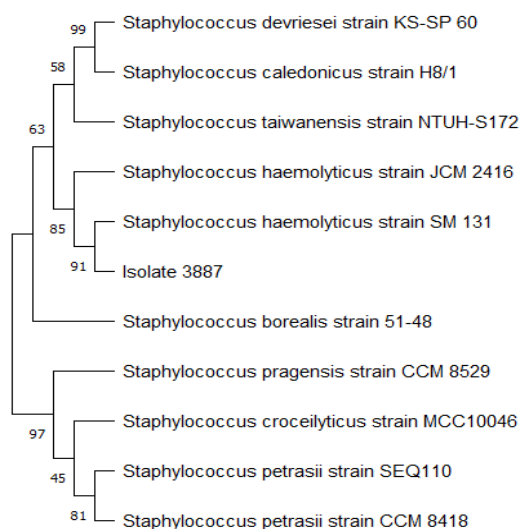
S. haemolyticus yang termasuk dalam spesies CoNS menunjukkan tingkat resistensi antibiotik tertinggi dalam kelompok bakteri *Staphylococcus* (Morgado *et al.* 2024). Spesies ini menyebabkan sekitar 10-20% infeksi klinis dan menjadi penyebab terbesar nomor dua penyakit infeksi setelah *S. epidermidis*. Ada beberapa penyakit yang tercatat akibat infeksi *S. haemolyticus* yaitu bakteremia, meningitis, infeksi mata, infeksi kulit, peritonitis, infeksi saluran kemih, dan disfungsi alat kelamin pria (Eltwisy *et al.* 2022). Spesies yang terlibat dalam infeksi nosokomial dan infeksi hewan di seluruh dunia ini memiliki prevalensi *Staphylococcus haemolyticus* yang resisten terhadap methicillin (MRSH). Akan tetapi, informasi tentang organisme ini masih berasal dari penelitian regional sehingga belum mengungkapkan peran strain *S. haemolyticus* dalam kesehatan masyarakat dunia.

Selanjutnya, isolat *S. haemolyticus* 3887 diperiksa suseptibilitasnya terhadap antibiotik yang dapat dilihat pada Tabel 4. Isolat *S. haemolyticus* 3887 masih sensitif terhadap 10 antibiotik (40% dari antibiotik yang diuji) dan respon intermediet terhadap 2 antibiotik (8%) dan ternyata sudah resisten terhadap 12 antibiotik (48%). Ketika isolat CoNS berkembang biak menjadi resisten terhadap antibiotik yang umum antibiotik yang digunakan, sebenarnya pengobatan dengan vancomysin (jenis glikopeptida) dianggap sebagai antibiotik pilihan (Kloos & Bannerman

1994). Namun, isolasi strain klinis *S. haemolyticus* dengan penurunan kerentanan terhadap vancomysin telah dilaporkan (Veach *et al.* 1990). Isolat *S. haemolyticus* 3887, selain resisten terhadap vancomysin 10-30 µg (Tabel 4), memiliki fenotipe resistensi yang lebih tinggi terhadap antibiotik clindamycin dan cefazolin. Hal ini dibuktikan oleh tidak terbentuknya zona bening di sekitar cakram antibiotik (Gambar 7).

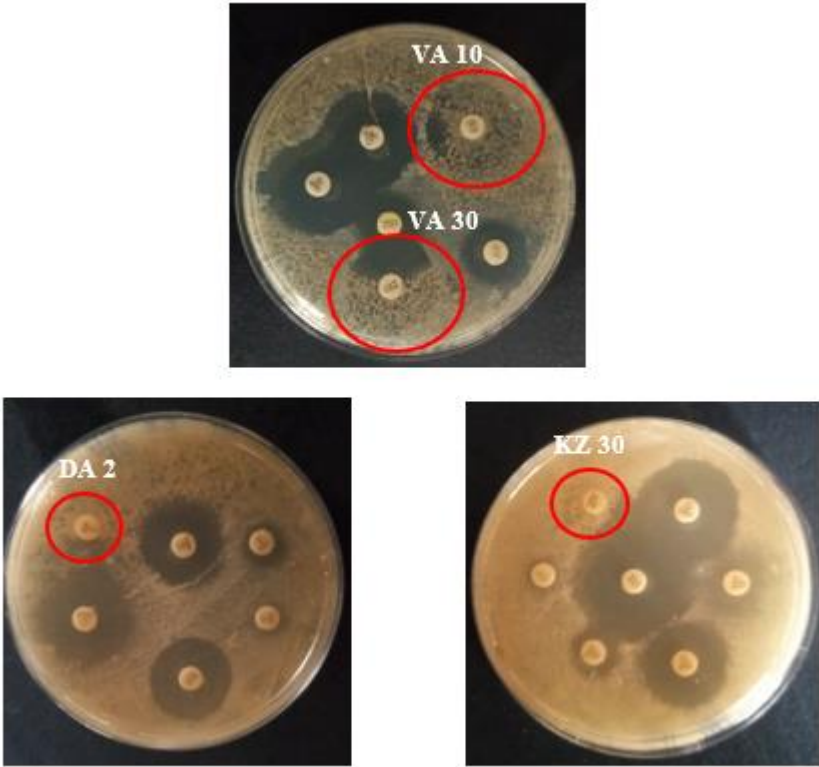
Hasil deteksi gen resisten antibiotik menunjukkan bahwa gen resisten clindamycin, yaitu *msrA* terdapat pada kromosom dan plasmid isolat 3887 (Gambar 8). Pada kromosom isolat 3887, pita gen *msrA* yang terbentuk lebih tebal dibandingkan pada plasmid. Hal ini menandakan bahwa konsentrasi gen *msrA* pada kromosom jauh lebih tinggi daripada plasmid. Penelitian lain telah melaporkan bahwa gen *msrA* juga terdapat pada *S. haemolyticus* yang berasal dari sampel klinis (Bakthavatchalam *et al.* 2017; Manoharan *et al.* 2021). Mekanisme resistensi gen *msrA* yaitu pembentukan pompa eflux (*efflux pump*). *Efflux pump* yang terbentuk akan memompa keluar antibiotik seperti jenis *macrolide* dan *streptogramin* B dari dalam sel sehingga menghambat kerja antibiotik (Aktas *et al.* 2007). Adapun gen resistensi clindamycin lainnya dan gen resisten cefazolin tidak terdeteksi baik pada genom maupun plasmid isolat 3887.

Mekanisme resistensi *efflux pump* ditemukan pada banyak bakteri patogen yang resistensi terhadap berbagai antibiotik (Bostanmaneshrad *et al.* 2020; Papkou *et al.* 2020). Penelitian Papkou *et al.* (2020) menemukan pompa eflux tunggal, pada gen *norA* antibiotik ciprofloxacin, menyebabkan variasi tinggi pada evolusi di seluruh isolat *Staphylococcus aureus*. Ekspresi *norA* yang meningkat mempotensiasi evolusi melalui mutasi enzim topoisomerase DNA, sehingga evolusi terjadi dengan cepat pada turunan generasi isolat tersebut.



Tabel 4. Hasil uji suseptibilitas antibiotik isolat 3887

Antibiotik	Hasil	Antibiotik	Hasil
Aminoglycoside		Cephalosporin	
Gentamicin (CN) 10 µg	S	Cefazolin (KZ) 30 µg	R
Amikacin (AK) 30 µg	S	Cefoxitin (FOX) 30 µg	S
Floroquinolone		Cefotaxime (CTX) 30 µg	R
Levofloxacin (LEV) 5 µg	R	Ceftazidime (CAZ) 30 µg	R
Ciprofloxacin (CIP) 5 µg	R	Penicillin	
Tetracycline		Amoxicillin (AMX) 10 µg	S
Tetracycline (TE) 10 µg	R	Amoxicillin (AML) 25 µg	S
Tetracycline (TE) 30 µg	I	Ampicillin (AMP) 10 µg	S
Tigecycline (TGC) 15 µg	S	Amoxicillin-Clavulanate (AMC) 30 µg	S
Glycopeptide		Piperacillin-Tazobactam (TZP) 110 µg	X
Vancomycin (VA) 10 µg	R	Carbapenem	
Vancomycin (VA) 30 µg	R	Meropenem (MEM) 10 µg	S
Macrolide		Lincosamide	
Erythromycin (E) 15 µg	R	Clindamycin (DA) 2 µg	R
Oxazolidinones		Lainnya	
Linezolid (LZD) 30 µg	R	Fosfomycin (FOS) 50 µg	R
Phenicol		Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT) 25 µg	S
Chloramphenicol (C) 30 µg	I		
PERSENTASE TOTAL			
Sensitif (S)		10/25 (40%)	
Intermediet (I)		2/25 (8%)	
Resisten (R)		12/25 (48%)	
Kejadian tak terduga (X)		1/25 (4%)	



Gambar 7. Suseptibilitas isolat 3887 terhadap antibiotik vancomycin (VA) 10 dan 30 µg clindamycin (DA) 2 µg dan cefazolin (KZ) 30 µg

Analisis gen resistensi pada penelitian ini masih berbasis analisis kualitatif dengan konvensional PCR. Untuk dapat menganalisis ekspresi gen *msrA* dan mungkin menganalisis gen-gen resisten yang lain, pendekatan kuantitatif PCR (qPCR) akan memperkuat kesimpulan mekanisme resistensi ini. Untuk dapat menganalisis mekanisme resistensi lebih lanjut, dengan metode biologi molekuler lainnya, seperti pengurutan seluruh genom (*whole genome sequencing*) dari isolat-isolat bakteri patogen dan studi keragaman genetik merupakan pendekatan fundamental yang dapat mengubah mikrobiologi klinis memberikan informasi mendalam tentang mekanisme resistensi serta memungkinkan prediksi strain yang cenderung berevolusi resistensi. Arah pengobatan ke depan dapat lebih efektif dan optimal.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi mikrobiologi (pewarnaan Gram dan uji biokimia), isolat 3887 merupakan CoNS (*Coagulase Negative Staphylococcus*). Setelah dilakukan Identifikasi lanjutan (identifikasi molekuler), terungkap bahwa isolat 3887 merupakan *S. haemolyticus* yang selanjutnya disebut *S. haemolyticus* 3887. Isolat *S. haemolyticus* 3887 dari pasien klinis rumah sakit ini memiliki resistensi terhadap 48% antibiotik yang diujikan dimana clindamycin dan cefazolin menunjukkan fenotipe resistensi yang paling kuat dan gen resistensi clindamycin dan cefazolin dengan gen clindamycin *msrA* yang terdeteksi baik pada kromosom maupun plasmid isolat *S. haemolyticus* 3887 yang menunjukkan bahwa mekanisme resistensi melalui proses *efflux pump*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek *Advanced Knowledge and Skills for Sustainable Growth in Indonesia* (AKSI – ADB) Universitas Riau atas program hibah penelitian mahasiswa (*Student Research Grant*) dengan Nomor Kontrak 778.22/UN19/KM.05.01/2022 atas nama Rexi Dwi Wardana dan Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Deputy Bidang Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset dan Teknologi dan Badan Riset dan Inovasi Nasional dengan Nomor Kontrak 205/SP2H/AMD/LT/DRPM/2020 atas nama Yuana Nurulita.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhiary, C.V. & Kolondam, B.J. (2020). Pemanfaatan gen 16s rRNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmakon*. **9(1)**: 16-22.
- Aktas, Z., Aridogan, A., Kayacan, C.B. & Aydin, D. (2007). Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *Journal of Microbiology*. **45(4)**: 286-290.
- Alahmadi, T.F.H., Alahmadey, Z.Z., Organji, S.R., Elbanna, K., Ahmad, I. & Abulreesh, H. H. (2021). First report of multi-drug resistant *Staphylococcus haemolyticus* in nosocomial infections in North Western Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. **15(2)**: 725–734.
- Amarasiri, M., Sano, D. & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **50(19)**: 2016-2059.
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K. & Prévost, G. (2019). Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*. **20(5)**: 1215.
- Bakthavatchalam, Y.D., Sudarsanam, T.D., Babu, P., Munuswamy, E., Sethuvel, D.P.M., Ragupathi, N.K.D. & Veeraraghavan, B. (2017). Methicillin-Susceptible Teicoplanin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Isolate from a Bloodstream Infection with Novel Mutations in the *tcaRAB* Teicoplanin Resistance Operon. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. **70(4)**: 458-460.
- Bostanmaneshrad, A., Nowroozi, J., Eslami, G. & Hashemi, A. (2020). The expression of efflux pump genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from blood cultures in Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, **15(5)**: 1-7.
- Cheesbrough, M. (2006). *District Laboratory Practice in Tropical Countries: Second Edition Part 2*. Cambridge University Press. Norfolk.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- Delmani, F., Jaran, A.S., Tarazi, Y.A., Masaadeh, H., Zaki, O. & Irbid, T. (2017). Characterization of ampicillin resistant gene (*blaTEM-1*) isolated from *E. coli* in Northern Jordan. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. **7(61)**: 11-15.
- Dharmayanti, N.L.P.I. (2011). Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*. **21(1)**: 1-10.
- Eltwisy, H.O., Twisy, H.O., Hafez, M.H., Sayed, I. M. & El-Mokhtar, M.A. (2022). Clinical infections, antibiotic resistance, and pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*. **10(6)**: 1130.
- Gharajalar, S.N. & Onori, M. (2019). Molecular detection of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

- isolates from dog dental plaque. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. **22(4)**: 419-427
- Jadubansa, P. & Sabin, R.C. (2009). Detection and Enumeration of Potentially Zoonotic Bacteria on a Cetacean Specimen During Maceration. *Collection Forum*. **23(1-2)**: 11-17.
- Kloos, W.E. & Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. **7(1)**: 117-140.
- Mahfut, M. (2020). Aplikasi filogenetik di dunia biologi kesehatan: melacak pandemi patogen. *teknosains: media informasi sains dan teknologi*. **14(2)**: 226-230.
- Manoharan, M., Sistla, S. & Ray, P. (2021). Prevalence and molecular determinants of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. *Microbial Drug Resistance*. **27(4)**: 501-508.
- Mazloumi, M. J., Akbari, R. & Yousefi, S. (2021). Detection of inducible clindamycin resistance genes (*ermA*, *ermB*, and *ermC*) in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology and Biotechnology Letters*. **49(3)**: 449-457.
- Michels, R., Last, K., Becker, S.L. & Papan, C. (2021). Update on coagulase-negative staphylococci—what the clinician should know. *Microorganisms*. **9(4)**: 830.
- Morgado, S., Freitas, F., Caldart, R., Fonseca, E., & Vicente, A.C. (2024). In-silico genomic characterization of *Staphylococcus haemolyticus* on a global scale: lineages, resistome, and virulome. *Journal of Infection and Public Health*. **17(1)**: 18-24.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*. **1(1)**: 1-6.
- Novard, M.F.A., Suharti, N. & Rasyid, R. (2019). Gambaran bakteri penyebab infeksi pada anak berdasarkan jenis spesimen dan pola resistensinya di laboratorium RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2014-2016. *Jurnal Kesehatan Andalas*. **8(2S)**: 26-32.
- Novita, R.I.D. & Febrianti, I. (2019). Pemanfaatan penggunaan darah donor yang telah kadaluwarsa untuk pembuatan agar darah pada pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Pendidikan*. **1(2)**: 64-69.
- Papkou, A., Hedge, J., Kapel, N., Young, B. & MacLean, R. C. (2020). Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. *Nature Communications*. **11(1)**: 3970.
- Reller, L.B., Weinstein, M.P. & Petti, C.A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. **44(8)**: 1108-1114.
- Shittu, A., Lin, J., Morrison, D. & Kolawole, D. (2004). Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *Journal of Medical Microbiology*. **53(1)**: 51-55.
- Simaremare, E.S., Gunawan, E., Dewi, K., Bakrie, N. F., Pratiwi, R.D. & Agustine, R. (2020). Pendidikan pemakaian obat dan antibiotik di Sekolah Menengah Pertama Negeri 11 Jayapura. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat (Indonesian Journal of Community Engagement)*. **6(4)**: 241-247.
- Subari, A., Razak, A. & Sumarmin, R. (2021). Phylogenetic analysis of *Rasbora* spp. based on the mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*. **21(1)**, 89-94.
- Trojan, R., Razdan, L., & Singh, N. (2016). Antibiotic Susceptibility Patterns of Bacterial Isolates from Pus Samples in a Tertiary Care Hospital of Punjab, India. *International Journal of Microbiology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9302692>
- Veach, L. A., Pfaller, M. A., Barrett, M., Koontz, F. P., & Wenzel, R. P. (1990). Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 2064 – 2068.
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteriamilolitik Pada Umbi Colocasia esculenta L. Secara Morfologi, Biokimia, Dan Molekuler. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, **6(2)**, 247–248.
- Wulandari, K.K., Rodja, H.A., Urjiyah, U.G., Fibriani, E. & Putri, F.A. (2021). Teknik diagnostik konvensional dan lanjutan untuk infeksi bakteri dan resistensi antibakteri di Indonesia. *Jurnal Widya Biologi*. **12(02)**: 98-116.
- Yusmaniar, Wardiyah, & Nida, K. (2017). Mikrobiologi dan Parasitologi. Pusdik SDM Kesehatan.