



PENGEMBANGAN PROTOKOL DETEKSI *Staphylococcus aureus* BERBASIS MOLEKULER

**Maharani Pertiwi Koentjoro^{1*}, Melinda Nuril Alviani², Yoga Dwi Jatmiko³,
Laila Nur Habibah⁴, Ahmad Nuril Fuad Al Fatih⁵,
& Hartati Kartikaningsih⁶**

^{1,4,5,&6}Program Studi Magister Pengelolaan Sumberdaya Lingkungan dan
Pembangunan, Sekolah Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Jalan MT. Haryono
Nomor 169, Malang, Jawa Timur 65145, Indonesia

²Program Studi D-IV Analis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul
Ulama Surabaya, Jalan Raya Jemursari Nomor 57, Surabaya, Jawa Timur 60237,
Indonesia

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas
Brawijaya, Jalan Veteran, Malang, Jawa Timur 65145, Indonesia

*Email: maharanipk@ub.ac.id

Submit: 30-10-2023; Revised: 09-12-2023; Accepted: 13-12-2023; Published: 30-06-2024

ABSTRAK: *Staphylococcus aureus* menjadi flora normal pada manusia, terutama di kulit dan hidung. Tetapi, apabila jumlahnya berlebih atau jika terdapat varian patogenik, maka dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan. Tujuan penelitian adalah mengembangkan metode deteksi *Staphylococcus aureus* berbasis molekuler, yaitu menggunakan gen primer norA. Gen norA pada *Staphylococcus aureus* diketahui berperan dalam patogenesis dengan kemampuan resistensinya terhadap antibiotik. Jenis penelitian ini adalah observasional analitik dengan metode *cross-sectional*. Metode dalam penelitian meliputi isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dari sarana fasilitas kesehatan. Isolasi dan identifikasi meliputi isolasi bakteri dengan media *Blood Agar Plate* (BAP); purifikasi isolate, pewarnaan gram; uji biokimia dengan media *Mannitol Salt Agar* (MSA), uji glukosa, uji *Voges Proskauer* (VP), uji katalase dan uji koagulase. Selanjutnya, isolate *Staphylococcus aureus* diuji menggunakan metode berbasis molekuler, yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini meliputi tahapan isolasi DNA, uji kualitatif dengan *elektroforesis gel agarose*, uji semi kuantitatif dengan *software image J*, amplifikasi dengan *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan primer gen norA. Hasil uji *Mann-Whitney* memberikan nilai $p = 0,334$ ($p > 0,05$) yang menunjukkan terdapat kesesuaian antara metode kultur dan metode PCR dengan protokol yang dikembangkan dalam mendeteksi *Staphylococcus aureus*. Metode yang dikembangkan meliputi penggunaan susunan basa dalam primer gen norA, optimasi suhu *annealing* dan *extension*, serta konsentrasi DNA *template* yang digunakan.

Kata Kunci: *Staphylococcus aureus*, Metode Kultur, *Polymerase Chain Reaction*, Gen NorA.

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* becomes a normal flora in humans, especially on the skin and in the nose. However, if it becomes excessive or if there are pathogenic variants, it can cause various health problems. The purpose of the study is to develop a molecular-based detection method for *Staphylococcus aureus* using the norA primer gene. The norA gene in *Staphylococcus aureus* is known to play a role in pathogenesis with its antibiotic resistance ability. This type of research is analytical observational with a cross-sectional method. The methods in the study include the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from healthcare facility equipment. Isolation and identification include bacterial isolation using *Blood Agar Plate* (BAP) media; isolate purification, Gram staining; biochemical tests using *Mannitol Salt Agar* (MSA) media, glucose tests, *Voges Proskauer* (VP) tests, catalase tests, and coagulase tests. Furthermore, *S. aureus* isolates were tested using a molecular-based method, namely *Polymerase Chain Reaction* (PCR). This method includes DNA isolation stages, qualitative testing with agarose gel electrophoresis, semi-quantitative testing with image J software, amplification with *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) using norA gene primers. The Mann-Whitney test results



gave a value of $p = 0.334$ ($p > 0.05$) indicating the suitability between the culture method and the PCR method with the developed protocol in detecting *Staphylococcus aureus*. The developed method includes the use of base sequences in the *nraA* gene primer, optimization of annealing and extension temperatures, and the concentration of DNA templates used.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Culture Method, Polymerase Chain Reaction (PCR), *nraA* Gene.

How to Cite: Koentjoro, M. P., Alviani, M. N., Jatmiko, Y. D., Habibah, L. N., Al Fatih, A. N. F., & Kartikaningsih, H. (2024). Pengembangan Protokol Deteksi *Staphylococcus aureus* Berbasis Molekuler. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 12(1), 50-60. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v12i1.9494>



Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi is Licensed Under a CC BY-SA [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Secara historis, *Staphylococcus aureus* telah diakui sebagai penyebab penting penyakit di seluruh dunia, termasuk infeksi kulit dan jaringan lunak, pneumonia, bakteremia, endokarditis, dan osteomyelitis (Nieman *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2022). Walaupun *Staphylococcus aureus* diketahui merupakan flora normal pada beberapa bagian tubuh manusia, tetapi kolonisasi dalam jumlah yang besar dapat menyebabkan infeksi bakteri. Pada umumnya, infeksi awal *Staphylococcus aureus* berlangsung tanpa menimbulkan gejala, dan ketika sistem imun tubuh mampu mengatasi, maka infeksi lanjut tidak terjadi. Tetapi, apabila sistem imun tubuh lemah atau sebelumnya telah ada infeksi virus atau bakteri lain, maka faktor virulensi *Staphylococcus aureus* akan muncul dan menimbulkan infeksi lanjut (Dalton *et al.*, 2020; Mansour *et al.*, 2021).

Staphylococcus aureus juga dilaporkan memiliki sejumlah mekanisme fisiologis untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel pada permukaan fomite dalam jangka waktu panjang. *Staphylococcus aureus* juga ditemukan mengkontaminasi sejumlah permukaan sarana kesehatan, termasuk kursi, AC, meja, keran, pusaran air, dan bangku kayu, serta barang-barang dalam ruangan, seperti telepon, remote TV, dan kartu ATM. Paparan *Staphylococcus aureus* menjadi faktor risiko kolonisasi bakteri ini pada sarana kesehatan dan memiliki kemungkinan meningkatnya resiko paparan ke petugas kesehatan atau penularan ke lingkungan (Awan *et al.*, 2021; Cheung *et al.*, 2021; Elisa *et al.*, 2022).

Oleh karena itu, deteksi keberadaan *Staphylococcus aureus* di lingkungan sarana kesehatan sangat penting dilakukan dengan segera, karena potensi infeksi nosocomial, penyebaran infeksi, adanya strain yang resistensi antibiotik sebagai upaya dalam pengendalian infeksi (Willis *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022). Dengan mengetahui keberadaan bakteri ini, langkah-langkah pencegahan dan pengendalian yang tepat dapat diambil, seperti meningkatkan kebersihan dan sanitasi, melaksanakan tindakan isolasi yang sesuai, dan memperkuat praktek kebersihan tangan (Howden *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2017; Nurlan *et al.*, 2023; Tarigan *et al.*, 2023).



Identifikasi *Staphylococcus aureus* secara konvensional dilakukan dengan kultur bakteri. Metode ini dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada suatu media pertumbuhan yang sesuai, dan pengujian morfologi sel dan koloni, serta pengamatan aktivitas biokimianya. Metode ini memiliki kelemahan dalam hal waktu pengerjaan dan kebutuhan akan bahan dan alat yang kompleks membuatnya tidak efisien diterapkan (Mesa *et al.*, 2022).

Pada masa sekarang, pendekatan molekuler menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dianggap lebih efisien daripada deteksi melalui kultur *Staphylococcus aureus*. Metode PCR dapat menyelesaikan proses dengan cepat dan memiliki sensitivitas serta akurasi yang lebih tinggi daripada metode kultur (Javid *et al.*, 2018). Pemilihan gen untuk mendeteksi *Staphylococcus aureus* dapat disesuaikan dengan tujuan spesifik deteksi, termasuk identifikasi spesies, deteksi strain, atau deteksi resistensi antibiotik. Desain primer yang spesifik harus dipilih untuk memperbesar fragmen gen yang diinginkan, dan teknik PCR atau metode molekuler lainnya dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan fragmen gen tersebut pada sampel yang diuji. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan protokol deteksi *Staphylococcus aureus* berbasis molekuler yang memungkinkan deteksi bakteri ini dengan cepat, menggunakan metode yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Selain itu, protokol ini juga dapat membantu dalam identifikasi strain dan faktor virulensi, sehingga tindakan pencegahan penyebaran bakteri ini dapat dilakukan secara efisien dan tepat waktu (Huang *et al.*, 2022).

METODE

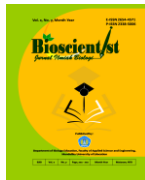
Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Metode penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan metode *cross-sectional*. Populasi penelitian ini adalah sarana fasilitas kesehatan di Laboratorium Klinik “X” Kota Surabaya. Pemilihan lokasi *sampling* berdasarkan pertimbangan sarana yang sering digunakan pasien dan disentuh atau digunakan dengan sentuhan kulit.

Isolasi, Purifikasi, dan Metode Kultur Isolat Bakteri dari Sarana Fasilitas Kesehatan

Sampel usap (*swab*) untuk isolasi *Staphylococcus aureus* diambil pada lokasi yang dianggap memiliki risiko paparan. Sampel kemudian disimpan dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diberi label seperti nama fasilitas dan tanggal pengambilan. Sampel sumber isolat *Staphylococcus aureus* didapatkan dengan cara menggosok bagian permukaan sarana fasilitas kesehatan dengan *cotton swab* steril selama 2 menit, dan dimasukkan dalam media NB. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini, yakni biakan murni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Lab Satu *web store*.

Sampel selanjutnya diinokulasi secara aseptik pada media *Blood Agar Base* (BAP) dan inkubasi ± 24 jam pada suhu 37°C . Koloni yang tumbuh pada media dipurifikasi pada media *Nutrient Agar* (NA) untuk selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopis, mikroskopis, pewarnaan gram, dan uji biokimia (uji fermentasi mannitol, uji katalase, uji koagulase, dan uji oksidase).



Metode PCR

Isolat bakteri selanjutnya dikultur dalam 5 mL media NB dan inkubasi \pm 24 jam pada suhu 37°C. Kultur ini digunakan untuk sumber isolasi DNA bakteri menggunakan Kit *Jetflex™ Genomic DNA Purification Kit*. Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan petunjuk manufaktur kit. DNA yang diperoleh kemudian diuji kualitas dan kuantitasnya menggunakan Nanodrop spektrofotometer pada panjang gelombang A6260 dan A280 nm. Uji ini digunakan untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi (Koentjoro *et al.*, 2021).

Dalam penelitian ini, metode *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* digunakan untuk secara langsung memantau proses amplifikasi gen *norA*. Amplifikasi dilakukan menggunakan primer spesifik *norA forward* 5'GACATTTACCAAGCCATCAA'3 dan primer *norA reverse* 5'TGCCATAAATCCACCAAT'3. Sebanyak 2 μ L sampel DNA dimasukkan dalam campuran *reagen* yang terdiri dari 12,5 μ L *Go Tag-Green Polymerase*, 8,5 μ L *nuclease free water* dan masing-masing 1 μ L *primer reverse* dan *primer forward*. Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus dengan *temperature PCR* pada tahap denaturasi awal 94°C selama 2 menit, tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, pada tahap *annealing* suhunya 56°C selama 30 detik dan tahap *elongasi* suhunya 72°C selama 30 detik. Pada akhir siklus, proses *elongasi* diperpanjang selama 5 menit dan dilakukan pada suhu yang sama (Koentjoro *et al.*, 2021).

Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh dari metode kultur dan RT-PCR selanjutnya dianalisis untuk mengetahui kesesuaian protokol PCR yang diuji. Uji protokol deteksi *Staphylococcus aureus* menggunakan IBM SPP *Statistic 21 (IBM Corporation)* dengan uji normalitas terlebih dahulu, jika data yang diperoleh terdistribusi tidak normal, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Protokol untuk mendeteksi suatu patogen tertentu memiliki manfaat untuk mempercepat proses deteksi dan identifikasi patogen. Hal ini diperlukan untuk menghambat penyebaran patogen dan mengendalikan infeksi dengan lebih efektif. Pada penelitian ini, beberapa tahapan awal dilakukan untuk mengembangkan protokol dalam identifikasi *Staphylococcus aureus* menggunakan metode berbasis molekuler.

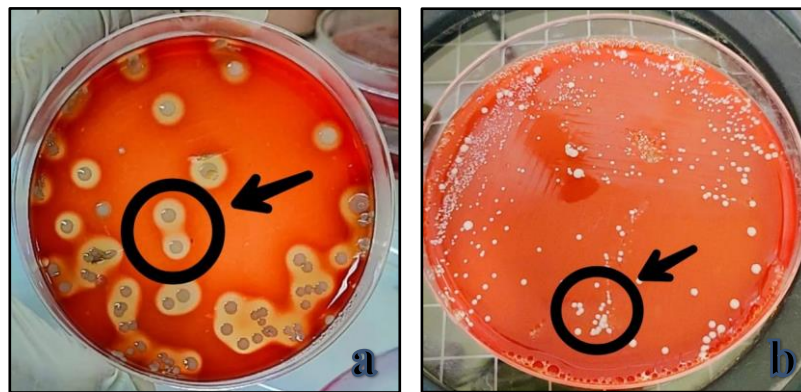
Isolasi, Purifikasi, dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* dari Sarana dan Fasilitas Kesehatan

Staphylococcus aureus merupakan flora normal kulit dan hidung manusia. Namun, spesies bakteri ini mampu menunjukkan perilaku patogenik yang menyebabkan infeksi. Jika *Staphylococcus aureus* tumbuh berlebihan, maka akan meningkatkan potensi patogeniknya. Pada orang dengan sistem imun rendah, infeksi *Staphylococcus aureus* dapat mengancam jiwa, seperti timbulnya pneumonia, osteomielitis, endokarditis, dan sepsis (Lee *et al.*, 2018; Wagenlehner & Dittmar, 2022).

Pada penelitian ini, sumber isolat *Staphylococcus aureus* diisolasi dari bagian permukaan sarana fasilitas kesehatan yang umumnya disentuh dan

digunakan oleh orang. Tong *et al.* (2015), menyebutkan koloni *Staphylococcus aureus* mampu bertahan hidup pada suatu permukaan, dan apabila tersentuh oleh orang lain dapat menjadi wahana penyebarannya. Studi yang dilakukan oleh Tolera *et al.* (2018), menunjukkan bahwa pasien yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* dapat menularkan infeksi melalui permukaan sarana dan fasilitas di lingkungan.

Kultur sampel *swab* yang diambil selanjutnya diinokulasikan ke dalam media NB dan dilanjutkan pada media BAP. Gambar 1 menyajikan hasil kultur pada media BAP yang selanjutnya diamati dan selanjutnya dipurifikasi serta diuji biokimia. Tujuan purifikasi dan uji biokimia dalam penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi, mengkarakterisasi, dan memahami sifat-sifat isolat *Staphylococcus aureus*. Proses ini sangat penting untuk berbagai aplikasi ilmiah, medis, dan industri. Hasil rangkuman pertumbuhan isolat pada media BAP disajikan pada Tabel 1.



Gambar 1. Hasil Isolasi Swab pada Media BAP. Tanda Panah Menunjukkan Bahwa Koloni Memiliki Hemolisis: a) β -Hemolisis; dan b) γ -Hemolisis.

Isolat kemudian dimurnikan dan yang menunjukkan konsistensi morfologi koloni dan sel pengamatan mikroskopis, yaitu memiliki bentuk sel yang sama dan morfologi sel yang seragam. Tahap ini bertujuan untuk memperoleh kultur murni dari *Staphylococcus aureus*. Isolasi dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media BAP. Hasil isolasi, purifikasi, dan identifikasi *Staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Isolasi, Purifikasi, dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* dari Sarana dan Fasilitas Kesehatan.

| Isolat | Pengamatan Mikroskopis | | Karakter Koloni | | | | | | |
|--------|------------------------|----------------|---------------------|----------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | Bentuk Sel | Pewarnaan Gram | Hemolisis | Bentuk | Margin | Elevasi | Ukuran | Tekstur | Pigmen |
| 1 | Coccus | Positif | β -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |
| 2 | Coccus | Positif | β -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Sedang | Halus | Putih |
| 3 | Coccus | Positif | γ -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |
| 4 | Coccus | Positif | γ -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |
| 5 | Coccus | Positif | β -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |
| 6 | Coccus | Positif | γ -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |
| 7 | Coccus | Positif | γ -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus | Putih |



| Isolat | Pengamatan Mikroskopis | | Karakter Koloni | | | | | |
|---------|------------------------|----------------|---------------------|---------------|---------|--------|---------|-------------|
| | Bentuk Sel | Pewarnaan Gram | Hemolisis | Bentuk Margin | Elevasi | Ukuran | Tekstur | Pigmen |
| 8 | Coccus | Positif | γ -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus Putih |
| 9 | Coccus | Positif | β -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Besar | Halus Putih |
| Kontrol | Coccus | Positif | β -Hemolisis | Ireguler | Rata | Datar | Kecil | Halus Putih |

Hasil dari isolasi bakteri pada media BAP menunjukkan sebanyak 4 sampel β -hemolisis dan 5 sampel γ -hemolisis. Uji ini dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus* kontrol dan hasil pengamatan morfologi (Tabel 2), menunjukkan rata-rata memiliki bentuk koloni dengan ciri ireguler, tepi koloni bakteri rata, ukuran kecil hingga besar, tekstur halus, dan berwarna putih.

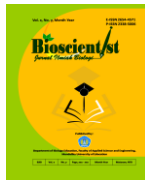
Tabel 2. Uji Biokimia dari Metode Kultur Isolat Bakteri dari Sarana dan Fasilitas Kesehatan.

| Isolat | Uji Biokimia | | | | | Kesimpulan |
|---------|--------------|-----------|----|-----------|----------|------------------------------|
| | MSA | Bentuk | VP | Koagulasi | Katalase | |
| 1 | Kuning | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 2 | Kuning | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 3 | Kuning | - | + | + | + | Negatif |
| 4 | Kuning | + | + | - | - | Negatif |
| 5 | Kuning | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 6 | Kuning | + dan gas | + | + | - | Negatif |
| 7 | Kuning | + dan gas | + | + | - | Negatif |
| 8 | Kuning | + dan gas | + | + | - | Negatif |
| 9 | Kuning | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Kontrol | Kuning | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Uji biokimia bakteri adalah metode yang umum digunakan untuk mengidentifikasi jenis-jenis bakteri tertentu. Dalam uji biokimia, berbagai senyawa kimia dan *reagen* digunakan untuk mengamati bagaimana bakteri merespon atau memetabolisme zat-zat tertentu. Hasil dari uji ini memberikan informasi tentang karakteristik fisiologis dari bakteri tersebut. Beberapa contoh uji biokimia yang umum digunakan untuk identifikasi *Staphylococcus aureus* antara lain, uji fermentasi gula, koagulasi, dan katalase. Kelemahan uji biokimia adalah membutuhkan waktu relatif panjang.

Metode Molekuler

Sampel yang telah dipurifikasi selanjutnya dibiakkan pada media NA untuk persiapan isolasi DNA. Sel bakteri yang tumbuh pada media NA setelah 24 jam, kemudian dipanen dan DNA-nya diisolasi menggunakan Kit *Jetflextm Genomic DNA Purification Kit*. Kualitas dan kuantitas DNA kemudian dianalisis melalui absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Rasio absorbansi A260/A280 berada pada rentang nilai 1,81-1,99, menunjukkan kualitas DNA yang baik dan dapat digunakan untuk tahap berikutnya. Selain itu, perhitungan kuantitas menunjukkan bahwa DNA tersebut mencukupi untuk digunakan sebagai *template* dalam proses RT-PCR. Tabel 3 menyajikan hasil amplifikasi gen *norA* yang dinyatakan dalam nilai CT (*Threshold Cycle*).



Tabel 3. Hasil Kuantifikasi Gen NorA melalui RT-PCR.

| Sampel | Nilai CT | Keterangan |
|---------|----------|------------|
| 1 | 30.433 | Positif |
| 2 | 28.006 | Positif |
| 3 | 35.624 | Negatif |
| 4 | 34.990 | Negatif |
| 5 | 29.661 | Positif |
| 6 | 38.836 | Negatif |
| 7 | 35.664 | Negatif |
| 8 | 35.944 | Negatif |
| 9 | 28.637 | Positif |
| Kontrol | 11.241 | Positif |

Keterangan:

CT < 35 = Positif; dan

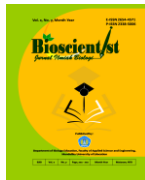
CT > 35 = Negatif.

Hasil analisis RT-PCR menunjukkan isolat nomor 1, 2, 5, dan 9 memiliki nilai CT kurang dari 36, sehingga dinyatakan positif memiliki gen norA. Hasil RT-PCR ini kemudian dianalisis kesesuaiannya dengan metode kultur. Tabel 4 menyajikan hasil identifikasi *Staphylococcus aureus* menggunakan metode kultur dan protokol RT-PCR berbasis molekuler. Hasil kesesuaian selanjutnya diuji distribusi datanya dan dilanjutkan dengan uji normalitas *Mann-Whitney*. Hasil analisis menunjukkan kesesuaian antara metode kultur dengan metode PCR yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa protokol RT-PCR berbasis molekuler yang dikembangkan, efektif dalam mendeteksi keberadaan *Staphylococcus aureus*, khususnya gen norA.

Tabel 4. Hasil Identifikasi *Staphylococcus aureus* Menggunakan Metode Kultur dan Metode PCR.

| No. | Kultur | RT-PCR |
|---------|--------|--------|
| 1 | + | + |
| 2 | - | - |
| 3 | + | + |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | - | - |
| 7 | - | - |
| 8 | - | - |
| 9 | + | + |
| 10 | + | + |
| 11 | - | - |
| 12 | - | + |
| 13 | + | + |
| 14 | + | + |
| 15 | - | + |
| 16 | - | + |
| 17 | + | + |
| Kontrol | + | + |

Uji distribusi dan uji normalitas *Mann-Whitney* bertujuan untuk memastikan kesesuaian antara kedua metode, dan hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara metode kultur dan RT-PCR dalam



mendeteksi keberadaan *Staphylococcus aureus*, serta gen *norA* yang terkait dengannya. Hasil ini menunjukkan bahwa protokol RT-PCR yang diusulkan dapat menjadi alternatif yang handal dan efisien dalam mendeteksi bakteri ini secara akurat dan cepat.

Pada metode RT-PCR, beberapa protokol yang perlu diperhatikan antara lain konsentrasi DNA yang digunakan sebagai *template* dan kualitasnya (Suleyman *et al.*, 2018). Kemudian, pada protokol yang dilaksanakan, amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus. Hal ini berarti proses PCR akan diulang sebanyak 40 kali, yang akan menghasilkan peningkatan jumlah DNA secara eksponensial pada setiap siklus. Apabila siklus terlalu pendek, maka hasil amplifikasi akan sulit diidentifikasi. Pada tahap denaturasi awal 94°C selama 2 menit, untai ganda DNA (*double-stranded* DNA) akan dipisahkan menjadi dua untai tunggal. Kemudian, pada tahap denaturasi di suhu 94°C selama 30 detik, DNA dipastikan benar-benar terdenaturasi, sehingga memungkinkan untuk pembentukan untai baru. Pemilihan suhu pada tahap denaturasi penting, karena apabila suhu terlalu rendah, untai ganda DNA tidak bisa terpisah dengan baik (Liu *et al.*, 2016).

Pada tahap *annealing* yang terjadi ketika suhu mencapai 56°C, primer DNA berikatan dengan wilayah target DNA yang spesifik. Tahap ini juga menentukan keberhasilan proses PCR, karena apabila suhu terlalu rendah, maka primer tidak akan bisa menempel ke DNA. Sebaliknya, apabila suhu terlalu tinggi, maka primer akan secara acak menempel ke DNA yang bukan *template*-nya. Semua tahapan PCR bersama-sama membentuk suatu siklus PCR, dan jumlah DNA target akan meningkat secara eksponensial setiap siklusnya. Kondisi suhu yang teroptimal penting dalam memastikan keberhasilan reaksi PCR dan mengoptimalkan hasil akhir yang diinginkan (McClure *et al.*, 2020; Obermeier *et al.*, 2020).

SIMPULAN

Penelitian ini mengembangkan protokol berbasis molekuler dalam deteksi *Staphylococcus aureus* dengan penekanan pada penggunaan gen primer *norA*. Kedua metode yang digunakan, yaitu metode kultur dan metode PCR menghasilkan hasil yang konsisten dalam mendeteksi keberadaan *Staphylococcus aureus*, menunjukkan kesesuaian antara keduanya. Beberapa faktor penting telah diidentifikasi dalam protokol PCR, termasuk suhu *annealing*, konsentrasi DNA *template*, dan jumlah siklus amplifikasi yang semuanya memainkan peran penting dalam keberhasilan amplifikasi gen *norA*. Dengan demikian, penelitian ini mengkonfirmasi bahwa pendekatan molekuler menggunakan PCR merupakan alternatif yang efisien dan efektif dalam mendeteksi keberadaan *Staphylococcus aureus*, khususnya dengan fokus pada gen *norA*. Protokol yang diusulkan mungkin dapat digunakan secara luas untuk pengawasan dan deteksi *Staphylococcus aureus* dalam konteks kesehatan masyarakat.

SARAN

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk memperluas cakupan protokol ini dan mengkonfirmasi keandalannya dalam mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* pada berbagai kondisi lingkungan dan sumber yang



berbeda. Dengan demikian, penelitian ini telah memberikan kontribusi penting terhadap pengembangan metode deteksi yang lebih efisien dan akurat untuk *Staphylococcus aureus* dengan implikasi signifikan dalam pengendalian infeksi di fasilitas kesehatan dan lingkungan sekitarnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

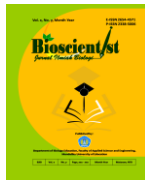
Terima kasih kami sampaikan kepada Sekolah Pascasarjana, Universitas Brawijaya yang telah memberikan bantuan dana melalui Hibah Penelitian Dosen Muda dengan Nomor Kontrak: 1558/UN10.F40/PT/2023.

DAFTAR RUJUKAN

- Awan, F., Ali, M. M., Mushtaq, M. H., & Ijaz, M. (2021). *Genetic Diversity in Staphylococcus aureus and its Relation to Biofilm Production*. London: IntechOpen.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Dalton, K. R., Rock, C., Carroll, K. C., & Davis, M. F. (2020). One Health in Hospitals: How Understanding the Dynamics of People, Animals, and the Hospital Built-Environment Can be Used to Better Inform Interventions for Antimicrobial-Resistant Gram-Positive Infections. *Antimicrob Resist Infect Control*, 9(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00737-2>
- Elisa, J. M., Raineri, R., Altulea, D., & Dijn, J. M. (2022). *Staphylococcal Trafficking and Infection-from 'Nose to Gut' and Back*. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), 1-22. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab041>
- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Lung T. W. F., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). *Staphylococcus aureus* Host Interactions and Adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 21(1), 380-395. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
- Huang, L., Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, L., Hao, H., Wang, X., & Cheng, G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, 11(4), 1-18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520>
- Javid, F., Taku, A., Bhat, M. A., Badroo, G. A., Mudasir, M., & Sofi, T. A. (2018). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Based on Coagulase Gene. *Veterinary World*, 11(4), 423-430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.423-430>
- Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial Infections: Epidemiology, Prevention, Control and Surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478-482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
- Koentjoro, M. P., Wilujeng, H. S., Dilla, A., & Prasetyo, E. N. (2021). Modifikasi Metode Isolasi DNA *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) untuk Sampel Epitel Pipi Manusia. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*, 2(2), 115-127. <https://doi.org/10.53699/joimedlabs.v2i2.54>



- Lee, A., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Kumar, S. M., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2016). PCR-Based Approaches for the Detection of Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Open Microbiology Journal*, 10(1), 45-56. <https://doi.org/10.2174/1874285801610010045>
- Mansour, N. A., Loubet, P., Pouget, C., Remy, C. D., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Molle V. (2021). *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13(10), 1-22. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- McClure, J. A., Conly, J. M., Obasuyi, O., Ward, L., Torres, A. U., Louie, T., & Zhang, K. (2020). A Novel Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Clinical Samples. *Frontiers in Microbiology*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01295>
- Mesa, L. E., Manrique, R., Muskus, C., & Robledo, S. M. (2020). Test Accuracy of Polymerase Chain Reaction Methods Against Conventional Diagnostic Techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in Patients with Clinical or Epidemiological Suspicion of CL: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007981>
- Nieman, A. E., Rozemeijer, W., Savelkoul, P. H. M., & Schade, R. P. (2022). Bacterial DNA Load in *Staphylococcus aureus* Bacteremia is Significantly Higher in Intravascular Infections. *PLoS ONE*, 17(4), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266869>
- Nurlan, N., Fitriadi, I., Safnowandi, S., Lukitasari, D., & Suadi, T. (2023). Sosialisasi Perilaku Hidup Bersih dan Sehat serta Pemahaman Deteksi Dini Gejala *Coronavirus Disease 2019* (Covid-19). *Nuras : Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 3(2), 72-78. <https://doi.org/10.36312/nuras.v3i2.184>
- Obermeier, M., Pacenti, M., Ehret, R., Onelia, F., Gunson, R., Goldstein, E., Chevaliez, S., Vilas, A., Glass, A., Maree, L., Krügel, M., Knechten, H., Braun, P., Naeth, G., Azzato, F., Danijela Lucic, D., Marlowe, N., Palm, M. J., Pfeifer, K., Reinhardt, B., Dhein, J., Joseph, A. M., Martínez-García, L., & Juan-Carlos Galán, J. C. (2020). Improved Molecular Laboratory Productivity by Consolidation of Testing on the New Random-Access Analyzer Alinity M. *Journal of Laboratory Medicine*, 44(6), 319-328. <https://doi.org/10.1515/labmed-2020-0102>
- Suleyman, G., Alangaden, G., & Bardossy, A. C. (2018). The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Current Infectious Disease Reports*, 20(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0620-2>
- Tarigan, G. E., Nawan, N., & Toemon, A. I. (2023). Identification and Resistance Testing of Bacteria Causing Nosocomial Infections in Surgery Inpatient Rooms. *Disease Prevention and Public Health Journal*, 17(1), 100-108. <https://doi.org/10.12928/dpphj.v17i1.6875>



- Tolera, M., Abate, D., Dheresa, M., & Marami, D. (2018). Bacterial Nosocomial Infections and Antimicrobial Susceptibility Pattern among Patients Admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. *Hindawi : Advance in Medicine*, 2018, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/2127814>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Jr, V. G. F. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Wagenlehner, F. M. E., & Dittmar, F. (2022). Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *European Urology*, 82(6), 658-668. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.08.023>
- Willis, J. A., Cheburkanov, V., Chen, S., Soares, J. M., Kassab, G., Blanco, K. C., Bagnato, V. S., de Figueiredo, P., & Yakovlev, V. V. (2022). Breaking Down Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Combining Antimicrobial Photodynamic and Antibiotic Treatments. *PNAS*, 119(36), 1-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208378119>
- Xiao, P., Liu, J., Yang, X., Wang, Y., Chen, W., Wang, C., Liu, Q., Shen, Q., Lu, G., & Yan, G. (2022). Multi-Site Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in a Six-Year Old Girl: A Case Report. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07148-1>
- Yu, X. H., Hao, Z. H., Liu, P. L., Liu, M. M., Zhao, L. L., & Zhao, X. (2022). Increased Expression of Efflux Pump *Nra* Drives the Rapid Evolutionary Trajectory from Tolerance to Resistance Against Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 66(12), 1-14. <https://doi.org/10.1128/aac.00594-22>