

## DETEKSI GEN *tst* ISOLAT *Staphylococcus aureus* MELALUI AMPLIFIKASI 23S rRNA ASAL SUSU KAMBING DAN SAPI PERAH

### *Detection *tst* Gene of *Staphylococcus aureus* Isolates Through Amplification of 23S rRNA from Goat's Milk and Dairy Cow's Milk*

Budi Prasetyo<sup>1</sup> dan Elizabeth Novi Kusumaningrum<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Terbuka, Jakarta  
E-mail: budi-p@ut.ac.id

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendeteksi gen *tst* isolat *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) susu sapi perah dan susu kambing melalui amplifikasi gen 23S rRNA sebagai langkah awal pencegahan beberapa kasus keracunan susu. Metode penelitian meliputi reidentifikasi bakteri, preparasi *deoxyribonucleic acid* (DNA), amplifikasi gen 23S rRNA, amplifikasi gen *tst*, dan pengurutan DNA. Hasil reidentifikasi bakteri melalui pewarnaan Gram, uji katalase, uji koagulase, uji fermentasi MSA, uji VJA, dan uji VP adalah positif bakteri *S. aureus*. Hasil amplifikasi gen *tst* terhadap 3 isolat *S. aureus* menunjukkan hanya 2 isolat memberikan hasil positif. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA yang memiliki panjang spesifik (350 bp) sesuai dengan produk *polymerase chain reaction* (PCR) dari referensi dan *database GeneBank*. Disimpulkan bahwa dengan menggunakan metode PCR dapat terdeteksi adanya gen *tst* pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan susu kambing dari Bogor.

Kata kunci: gen *tst*, *S. aureus*, susu kambing, susu sapi

#### ABSTRACT

This experiment was aimed to detect *tst* gene of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolates from dairy cow's milk and goat's milk through amplification of 23S rRNA as a preventive step of milk poisoning cases. Research methods implemented in this study were reidentification bacteria, *deoxyribonucleic acid* (DNA) preparation, amplification of 23S rRNA gene, *tst* gene amplification, and DNA sequencing. The results of bacteria reidentification by Gram staining, catalase test, coagulase test, MSA fermentation test, VJA test, and VP test was positive *S. aureus* bacterium. *Tst* gene amplification results against 3 isolates of *S. aureus* showed only 2 positive results. A positive result is indicated by the presence of DNA fragments that have a specific length (350 bp) corresponding to the *polymerase chain reaction* (PCR) products of reference and *GeneBank* database. It was concluded that the PCR method can be used to detect *tst* gene of *S. aureus* isolates originated from dairy cow's milk and goat's milk from Bogor.

Key words: *tst* gene, *S. aureus*, cow's milk, goat's milk

#### PENDAHULUAN

Produk minuman susu sebagai salah satu sumber makanan bergizi sering berpotensi menyebabkan keracunan (Suwito, 2010). Keracunan yang ditimbulkan tersebut sebagai akibat adanya kontaminasi dan penanganan kurang tepat selama proses pengolahan sehingga susu mengalami kerusakan dan tidak layak untuk dikonsumsi. Beberapa kasus keracunan yang disebabkan oleh konsumsi minuman susu terjadi di beberapa daerah di Indonesia, yakni pada bulan September 2004 pada 72 siswa Sekolah Dasar di Tulung Agung Jawa Timur, pada tanggal 2 Juni 2009 pada 10 siswa Sekolah Dasar di Cipayang Jakarta Timur, dan 293 siswa Sekolah Dasar di Kecamatan Sindangkatra, Kabupaten Bandung. Hasil analisis Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) menyimpulkan bahwa penyebabnya adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Suwito, 2010).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri patogen penyebab sebagian besar infeksi pada manusia, mulai dari infeksi kulit yang sangat sederhana sampai mampu menginfeksi sistem kekebalan tubuh. *Toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) merupakan satu dari beberapa toksin yang dihasilkan oleh *S.*

*aureus*. Toksin TSST-1 mampu mengakibatkan penyakit multiorgan pada manusia yang disebut *toxic shock syndrome* (TSS). Toksin TSST-1 disandikan oleh gen *tst* (*toxic shock toxin*) (See dan Chow, 1989). Gen *tst* tersebut berlokasi pada kromosom bakteri dalam pola unsur genetik 15-19 kb *pathogenicity islands* (SaPIs) (Ruzin *et al.*, 2001).

Tertelannya TSST-1 melalui makanan oleh manusia merupakan penyebab terjadinya keracunan. Menurut hasil riset Yarwood *et al.* (2002), diprediksi selain enterotoksin ditemukan juga TSST-1 dalam aktivitas biologi dan beberapa kasus keracunan makanan. Hal serupa juga pernah disampaikan oleh Orwin *et al.* (2001), bahwa TSST-1 yang dihasilkan oleh *S. aureus* merupakan penyebab utama keracunan makanan, karena banyaknya kemiripan aktivitas biologi antara TSST-1 dengan *staphylococcal* enterotoksin. Penelitian ini bertujuan mendeteksi gen *tst* isolat *S. aureus* susu sapi perah dan susu kambing sebagai langkah awal dalam pencegahan beberapa kasus keracunan susu.

#### MATERI DAN METODE

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan penelitian meliputi reidentifikasi bakteri, preparasi *deoxyribonucleic acid* (DNA), desain primer,

amplifikasi gen 23S rRNA, amplifikasi gen *tst*, dan pengurutan DNA. Terdapat dua kegiatan dalam reidentifikasi bakteri, yaitu *screening* dan *confirmation* (meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, uji koagulase, uji fermentasi MSA, uji VJA, dan uji VP). Di dalam kegiatan preparasi DNA, molekul DNA dari *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Adapun desain primer oligonukleotida spesifik untuk gen 23S rRNA dan gen *tst* disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Desain primer oligonukleotida gen 23S rRNA

Target	R/F	Urutan Basa	Jumlah Basa	Produkt PCR
23S rRNA	F	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	20	2720 bp
	R	GAAGGCGACTTTCTGGTCTG	20	
<i>tst</i> gene	F	TTTCCAATAACCACCCGTTT	20	350 bp
	R	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	20	

Amplifikasi gen 23S rRNA dari *S. aureus* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400 (Parkin Elmer). Kegiatan PCR yang dilakukan adalah: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C, selanjutnya diikuti dengan denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 55° C selama 45 detik untuk, *elongation* 72° C selama 1 menit, amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72° C. Total DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta bufernya. Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel *agarose* 1,5% menggunakan bufer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 300$  nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave*. Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

Amplifikasi gen *tst* dari *S. aureus* menggunakan PCR mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400 (Parkin Elmer). Kegiatan PCR yang digunakan adalah: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C, selanjutnya diikuti dengan denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 50-60° C selama 45 detik, dan *elongation* 72° C selama 1 menit, dan amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72° C. Total DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta bufernya. Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel *agarose* 1,5% menggunakan bufer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA).

Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 300$  nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave*. Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

### Pengurutan DNA

Pengurutan DNA dilakukan sesuai petunjuk Nelson *et al.* (2001). Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan menggunakan *GFX Column purification kit* (Amersham, USA), selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan reaksi pengurutan DNA. Kondisi untuk reaksi pengurutan adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94° C, selanjutnya diikuti dengan denaturasi 94° C selama 30 detik, 50-60° C selama 45 detik, 72° C selama 1 menit, reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72° C.

Produk reaksi pengurutan dipurifikasi menggunakan kolom autoseq G-50, kemudian DNA dikonsentrasikan dengan penambahan alkohol absolut yang dilanjutkan dengan pencucian menggunakan alkohol 70%. Setelah kering, ditambahkan ke dalamnya 6 µl *stop solution*. Larutan diinkubasikan pada 72° C selama 5 menit dan kemudian dimasukkan ke dalam es. Pengurutan DNA dilakukan menggunakan alat pengurut otomatis *ALFexpress II* (Amersham pharmacia biotech), pada kondisi 1500 V, arus listrik 60 mA, daya 25 W, suhu 55° C, selama 70 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Reidentifikasi *S. aureus*

Karakteristik isolat *S. aureus* pada media menunjukkan bentuk koloni bulat besar, bulat kecil, berkelompok seperti buah anggur, dan beberapa ireguler, dengan warna putih dan kuning terdapat zona bening hemolisis. Zona hemolisis terbentuk karena adanya toksin hemolisin yang diproduksi oleh *S. aureus*. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diduga *S. aureus* secara morfologi ternyata benar termasuk Gram positif karena sel bakterinya berwarna ungu.

Secara keseluruhan dari hasil uji-uji pengamatan makroskopis *S. aureus* menunjukkan hasil positif. Uji katalase pada *S. aureus* yang dilakukan dengan larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada koloni terpisah menunjukkan hasil positif, yakni dengan terbentuknya gelembung udara di sekitar koloni bakteri. Menurut Todar (2005), uji katalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Carter dan Wise (2004) mengungkapkan bahwa katalase tidak dihasilkan oleh genus *Streptococcus* tetapi hanya dihasilkan oleh genus *Staphylococcus*. Uji koagulase yang dilakukan juga menunjukkan hasil positif. Hal tersebut ditandai dengan terbentuknya *clot*/koagulan di dalam tabung. Hasil uji fermentasi manitol pada *S. aureus* dinyatakan positif karena tampak terjadi perubahan warna pada medium MSA merah muda menjadi kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa *S.*

*aureus* memfermentasi manitol yang kemudian menghasilkan asam laktat, sehingga dapat mengubah pH medium. Adapun hasil uji terhadap 3 isolat juga menunjukkan positif, ditandai dengan terjadinya perubahan warna putih transparan menjadi hitam yang dikelilingi zona kuning pada media. Pada media ini, *S. aureus* mempunyai koloni hitam sebagai akibat pengendapan hasil reduksi *tellurite*. Media di sekitar koloni berubah menjadi kuning akibat fermentasi manitol. Hasil uji menunjukkan adanya kandungan asetoin yang diproduksi dalam larutan, ditandai dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah muda.

#### Isolasi DNA *S. aureus*

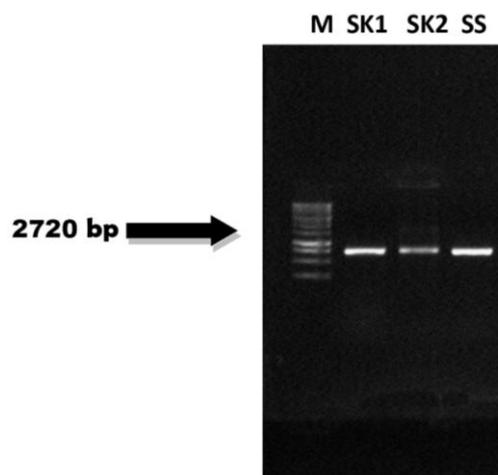
Pada penelitian ini ekstraksi kromosom DNA dilakukan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman). Perlakuan pemberian panas dan enzim katalitik dilakukan karena *S. aureus* tergolong dalam bakteri Gram positif yang memiliki dinding mengandung lapisan peptidoglikan tebal, protein, asam teikoat, asam teikuronat, dan polisakarida. Tahapan berikutnya untuk menyempurnakan proses pelisisan dinding bakteri ditambahkan lisozim, karena dinding sel *S. aureus* sensitif terhadap lisozim (Tortora *et al.*, 2007). Selain lisozim juga diberikan enzim proteinase K, selanjutnya diekstrak dengan pelarut organik untuk membantu enaturasi, dan koagulasi protein. Protein sebagian besar mengalami presipitasi pada interfase antara fase organik dan fase *aqueous*. Fase *aqueous* yang bening dan mengandung DNA dipindahkan ke tabung eppendorf baru. Pembersihan *debris* sel dilakukan dengan cara sentrifugasi sehingga diharapkan hanya tertinggal DNA. Selanjutnya dilakukan penambahan garam, asam, etanol, dan perlakuan dingin untuk mengendapkan DNA sehingga membentuk serabut-serabut berwarna putih. Penambahan etanol tersebut juga mampu mencuci DNA dari oligonukleotida-oligonukleotida kecil, sisa-sisa deterjen, dan sisa-sisa pelarut organik yang digunakan untuk menghilangkan protein. Kemudian DNA yang diperoleh harus disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk menghindari terjadinya aktivitas enzim nuklease (Taylor *et al.*, 2005).

#### Amplifikasi gen 23S rRNA

Keunggulan gen 23S rRNA dibandingkan dengan gen 16S rRNA adalah gen 23S rRNA mengandung urutan lebih panjang, sisipan dan atau penghapusan yang unik, dan diprediksi memiliki resolusi filogenetika lebih baik karena variasi urutannya lebih tinggi (Ludwig dan Schleifer, 1994). Hunt *et al.* (2006) menunjukkan, bahwa gen 23S rRNA juga mengandung daerah *conserved* untuk mendesain primer dengan derajat kesamaan hampir sama dengan primer untuk gen 16S rRNA.

Pada penelitian ini sebanyak 3 isolat *S. aureus* memberikan hasil positif pada uji reidentifikasi, selanjutnya dikonfirmasi identitas spesiesnya secara molekuler. Adapun hasil yang ditemukan pada

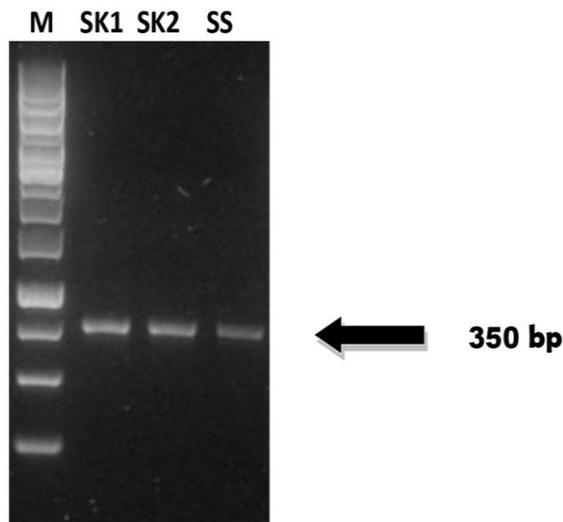
penelitian ini, ketiga isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen 23S rRNA. Kriteria kondisi reaksi PCR meliputi predenaturasi suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 40 detik, *annealing*  $55^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *elongation*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *post-elongasi*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dengan siklus 35 kali putaran. Kesesuaian kondisi amplifikasi tersebut, tampak dari hasil amplifikasi gen 23S rRNA dengan dielektroforesis menggunakan 1,5% gel agarose, yang dilanjutkan dengan visualisasi pada UV transluminator. Pada Gambar 1 tampak *fragmen/band* 23S rRNA teramplifikasi sangat jelas, berpita tunggal, dan berukuran 2720 bp (sesuai dengan *database GeneBank*).



**Gambar 1.** Hasil elektroforesis gen 23S rRNA (M= marker DNA; SK1= susu kambing 1; SK2= susu kambing 2; SS= susu sapi)

#### Amplifikasi gen *tst*

Dua isolat yang telah dikonfirmasi identitasnya sebagai *S. aureus*, kemudian diuji karakter keberadaan faktor virulensinya menggunakan metode PCR dengan mengamplifikasi gen *tst*. Optimasi PCR menggunakan *mix* PCR Kapa 2G Fast Ready Mix dengan konsentrasi 12,5  $\mu\text{l}$ , primer *forward* (F) dan *reverse* (R) masing-masing 1  $\mu\text{l}$ , konsentrasi DNA *template* 1  $\mu\text{l}$  dan konsentrasi  $\text{ddH}_2\text{O}$  sebanyak 9,5  $\mu\text{l}$  untuk memenuhi volume akhir tiap sampel 25  $\mu\text{l}$ . Data urutan isolat yang digunakan untuk merancang primer *tst1* dan *tst2* adalah data isolat yang diperoleh dari *GeneBank*. Primer *tst1* didesain sendiri menggunakan program *primer3 online*. Primer *tst2* didesain dengan mengikuti acuan Jaulhac *et al.* (1992) yang telah disitasi oleh Hayakawa *et al.* (2000). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, yaitu 2 isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *tst*. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA dengan panjang spesifik (350 bp) sesuai dengan produk PCR dari referensi dan dari *database GeneBank*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kedua primer *tst1* dan *tst2* dapat menempel pada region yang sesuai di dalam genom *S. aureus*. Ini berarti region yang sesuai tersebut adalah region gen *tst* seperti yang disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis gen *tst* (M= marker DNA; SK= susu kambing 1; SK2= susu kambing 2; SS= susu sapi)

### Pengurutan DNA

Pada penelitian ini hasil sekuensing 23S rRNA terbukti negatif. Beberapa kemungkinan yang dapat menyebabkan tidak tampaknya fragmen atau *band* DNA tersebut antara lain a) adanya masalah pada *DNA template* (jumlahnya tidak mencukupi), b) adanya masalah pada primer (jumlahnya tidak mencukupi dan primer tidak berinteraksi dengan *template* secara efisien), dan c) *master mix (tag polymerase)* yang digunakan kurang sensitif terhadap gen *tst*.

### KESIMPULAN

Berdasarkan uraian pembahasan dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan metode PCR dapat terdeteksi adanya gen *tst* pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan susu kambing dari Bogor.

### DAFTAR PUSTAKA

- Carter, G.R. and D.J. Wise. 2004. **Essentials of Bacteriology and Mycology**. 6<sup>th</sup> ed. Iowa State Press, USDA.
- Hayakawa, Y., M. Akagi, M. Hayashi, T. Shimano, H. Komae, O. Funaki, T. Kaidoh, and S. Takeuchi. 2000. Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. **Vet. Microbiol.** 72:321-327
- Hunt, D.E., V. Klepac-Ceraj, S.G. Acinas, C. Gautier, and S. Bertilsson. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. **Appl. Environ. Microbiol.** 72:2221-2225
- Jaulhac, B., M. Bes, N. Bomstein, Y. Piemont, Y. Brun, and J. Fleurette. 1992. Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E, and for TSST-1 in Staphylococcal strains. **J. Appl. Microbiol.** 72:386-392.
- Ludwig, W. and K.H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiol. Rev.** 15:155-173.
- Nelson, F.K., M. Snyder, A.F. Gardner, L.H. Cynthia, A.S. Jay, J.P. Gregory, M.C. George, M.A. Frederick, J. Jingyue, K. Jan, and E.S. Barton. 2001. **Current Protocols in Molecular Biology: Introduction and Historical Overview of DNA Sequencing**. John Wiley & Sons, New York.
- Orwin, P.M., D.Y.M. Leung, H.L. Donahue, R.P. Novick, and P.M. Schlievert. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin. **Infect. Immun.** 69(1):360-366.
- Ruzin, A., J. Lindsay, and R.P. Novick. 2001. Molecular genetics of SaPII-a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.** 41:365-377.
- See, R.H. and A.W. Chow. 1989. Microbiology of toxic shock syndrome: Overview. **Rev. Infect. Dis.** 11:55-60.
- Suwito, W. 2010. Bakteri yang sering mencemari susu: Deteksi, pathogenesis, epidemiologi, dan cara pengendaliannya. **J. Litbang Pertanian** 29(3):32-39.
- Taylor, M. dan S. Atri. 2005. **Development in Microwave Chemistry**. Evalueserve, United Kingdom.
- Todar, K. 2005. **Staphylococcus**. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology, USA.
- Tortora, G.J., B.R. Funke, and C.L. Case. 2007. **Microbiology: An Introduction**. 9<sup>th</sup> ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Yarwood, J.M., J.K. Mc Cormick, M.L. Paustian, P.M. Orwin, V. Kapur, and P.M. Schlievert. 2002. Characterisation and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. **J. Biol. Chem.** 277:13147-13188.