

## Optimasi Konsentrasi Primer Dan Suhu Annealing Dalam Mendeteksi Gen *blaZ* Pada Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* Di Udara

### Optimization of Primary Concentration and Annealing Temperature in Detecting *blaZ* Gene in Airborne *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Bacteria

Anisah Mardiana<sup>1</sup>

Kurnia Ritma Dhanti<sup>2\*</sup>

Kurniawan<sup>3</sup>

Retno Sulistyowati<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universitas Muhammadiyah  
Purwokerto, Purwokerto, Indonesia

<sup>2</sup>Universitas Muhammadiyah  
Purwokerto, Purwokerto, Indonesia

<sup>3</sup>Universitas Muhammadiyah  
Purwokerto, Purwokerto, Indonesia

<sup>4</sup>Universitas Muhammadiyah  
Purwokerto, Purwokerto, Indonesia

\*email: kurniaritmadhanti@ump.ac.id

#### Abstrak

*Staphylococcus aureus* adalah spesies bakteri yang sering kali teridentifikasi menjadi sumber penginfeksi dan telah meningkat penemuan kasus resistensinya. Resistensi terhadap antibiotik golongan Penisilin pada *S. aureus* dikaitkan oleh plasmid yang memuat gen *bla-Z* pengkode  $\beta$ -Laktamase. Beberapa faktor yang dapat dimodifikasi untuk mendapatkan hasil pengujian yang optimal dalam PCR yaitu suhu *annealing* dan konsentrasi primer. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang menghasilkan produk PCR dengan *band* terbaik dalam mendeteksi gen *blaZ* pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Desain penelitian yang digunakan dengan metode eksperimental. Hasil penelitian yang didapat yaitu produk PCR dengan konsentrasi primer 10  $\mu$ M terlihat jelas, tebal dan bersih, dibandingkan konsentrasi primer 5  $\mu$ M. Dengan hasil *band* terbaik pada suhu *annealing* 61.8°C dan 58.7°C. Penelitian ini menyimpulkan konsentrasi primer untuk mendapatkan hasil *band* yang terlihat dengan jelas yaitu 10  $\mu$ M. Suhu *annealing* 61.8°C menghasil *band* paling baik pada kode sampel R.PG.U4, R.V.U2, dan R.151.U2. Sedangkan kode sampel R.IGD.U5 hasil *band* paling baik pada suhu *annealing* 58.7°C.

#### Kata Kunci:

Gen *blaZ*; Konsentrasi Primer; PCR; Suhu *Annealing*.

#### Keywords:

*blaZ* Gene; Primer Concentration; PCR; Annealing Temperature.

#### Abstract

*Staphylococcus aureus* is a species of bacteria that is often identified as a source of infection and has increased the number of cases of resistance. Resistance to Penicillin-class antibiotics in *S. aureus* is associated with plasmids containing the *bla-Z* gene encoding  $\beta$ -Lactamase. Some factors that can be modified to obtain optimal test results in PCR are annealing temperature and primary concentration. This study aims to identify the primary concentration and annealing temperature that produce PCR products with the best band in detecting the *blaZ* gene in *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria. The research design used experimental methods. The results of the study obtained were PCR products at primary concentrations of 10  $\mu$ M were clearly visible, thick and clean, compared to primary concentrations of 5  $\mu$ M. Annealing temperature with the best band results at temperatures of 61.8 °C and 58.7°C. This study concluded the primary concentration to obtain a clearly visible band result of 10  $\mu$ M. The annealing temperature of 61.8°C produced the best band in the sample code R.PG. U4, R.V.U2, and R.151.U2 temperatures. While the sample code R.IGD. U5 band results best at annealing temperature 58.7°C.

## PENDAHULUAN

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram positif, berbentuk kokus, yang sel-selnya membentuk kelompok seperti anggur dan tidak bergerak (Erlin et al., 2020). *S. aureus* merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan

berbagai penyakit yang dapat sembuh sendiri hingga mengancam jiwa pada manusia (Akinola et al., 2022). *S. aureus* adalah salah satu spesies bakteri yang sering kali teridentifikasi menjadi sumber penginfeksi dan telah meningkat penemuan kasus resistensinya. *S. aureus* telah diidentifikasi sebagai organisme yang

menyebabkan infeksi saluran pernapasan bagian bawah terbanyak keempat, menurut penelitian yang dilakukan di satu lokasi rumah sakit (Halim & Setiawan, 2020).

Beberapa strain *S. aureus* dapat resisten secara fenotip terhadap beberapa golongan antibiotik (Akinola et al., 2022). Resistensi terhadap antibiotik golongan Penisilin pada *S. aureus* dikaitkan oleh plasmid yang memuat gen *bla-Z* pengkode  $\beta$ -Laktamase (Pratiwi et al., 2019). *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan bakteri *S. aureus* yang telah mengalami resistensi yang disebabkan oleh perubahan genetik (Pristianingrum et al., 2021). *S. aureus* mempunyai daya ketahanan akibat perubahan genetik yang disebabkan oleh terapi antibiotik yang irasional (Suyasa & Mastra, 2020). Penyebaran MRSA dirumah sakit dapat terjadi melalui peralatan medis, pakaian, udara serta melalui kontak langsung dengan staf medis. Oleh karena itu MRSA yang bersifat multiresisten terhadap antiseptik dan antibiotik harus diwaspadai (Erlin et al., 2020).

Teknik PCR memiliki beberapa tahapan penting, salah satunya yaitu tahap *annealing* (penempelan primer). Suhu *annealing* merupakan suhu yang memungkinkan primer menempel pada DNA cetakan (Hutabarat et al., 2021). Tinggi rendahnya Suhu *annealing* yang digunakan dapat ditentukan berdasarkan nilai *melting temperature* ( $T_m$ ) pada masing-masing primer, yang suhu terendahnya 5°C dibawah *melting temperature* ( $T_m$ ) (Herman et al., 2017). Menemukan kondisi suhu *annealing* yang optimal sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitivitas hasil PCR (Anggisti & Roslim, 2018).

Beberapa faktor yang dapat dimodifikasi untuk mendapatkan hasil pengujian yang optimal dalam PCR yaitu suhu *annealing* dan konsentrasi primer (Triyaningsih et al., 2022). Primer dengan konsentrasi yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, dapat mempengaruhi sensitivitas saat reaksi PCR berlangsung (Yustinadewi et al., 2018), hal ini dapat berpengaruh terhadap hasil saat dilakukan pembacaan menggunakan UV transiluminator. Hasil yang terlihat dapat berupa

*band* yang muncul dengan jelas dan tebal atau dapat muncul dengan samar dan tipis (Wasiati et al., 2022). Oleh karena itu optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer perlu dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh produk PCR dengan *band* yang baik dan sesuai target (Pratiwi et al., 2019).

## METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah sampel DNA bakteri MRSA kode R.PG.U4, R.IGD.U5, R.V.U2, R.151.U2, agarose, 1x *TAE Buffer*, mikro tip, mikrotube, *tube* PCR, MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd.), Primer gen *blaZ* (IDT), *Ethidium bromide*, *loading dye* (Geneaid), DNA ladder 100bp (Geneaid), dan aquabides (*ddH2O*).

Sebanyak 1.5 ml kultur bakteri MRSA yang sudah ditumbuhkan pada media *Lactose Broth* (LB) diambil sebagai sampel, kemudian diekstraksi menggunakan *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) yang berisi *binding buffer*, *lisis buffer*, *elution buffer*, *wash buffer* dan *inhibitor removal buffer*. Prosedur ekstraksi menggunakan panduan dari *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), kemudian sampel DNA hasil ekstraksi disimpan dalam suhu -20°C dan digunakan sebagai sampel DNA template pada proses PCR.

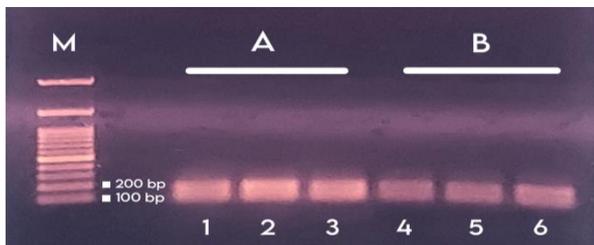
Proses PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *Mastercycler Nexus Gradient* (Eppendorf) dengan pengaturan pemrograman tahap predenaturasi pada suhu 95°C dalam waktu 5 menit, tahap denaturasi pada suhu 94°C dalam waktu 15 detik, tahap penempelan primer (*annealing*) menggunakan gradient suhu 52°C, 54.2°C, 58.7°C, 61.8°C, dan 64°C dalam waktu 30 detik, tahap *extension* (pemanjangan) pada suhu 72°C dalam waktu 1 menit dan tahap *final extension* (pemanjangan akhir) pada suhu 72°C dalam waktu 5 menit sebanyak 30 siklus pengulangan. Amplifikasi DNA templat menggunakan primer gen *blaZ* (Intergrated DNA Technologies). Komposisi campuran untuk PCR dalam satu reaksi 25  $\mu$ L adalah 12.5  $\mu$ L MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd.), primer

*forward* konsentrasi 5  $\mu$ M dan 10  $\mu$ M masing-masing 2  $\mu$ L, primer *reverse* konsentrasi 5  $\mu$ M dan 10  $\mu$ M masing-masing 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L DNA dan sebanyak 6.5  $\mu$ L aquabides (ddH<sub>2</sub>O).

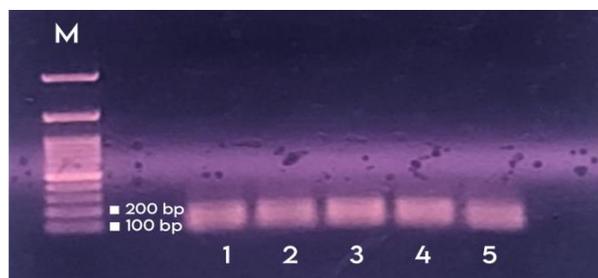
Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan konsentrasi 1% gel agarose dan 1  $\mu$ L pewarna *ethidium bromide*. Satu *well* terdiri dari 5  $\mu$ L ampikon dan 1  $\mu$ L *loading dye* (Geneaid). Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan arus listrik 100 volt menggunakan TAE *buffer* 1X, kemudian divisualisasi dengan UV Transilluminator. Panjang pita molekul DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan membandingkan DNA Ladder (Geneaid) yang berukuran 100 bp. Isolat MRSA yang positif teridentifikasi gen *blaZ* ditandai dengan terbentuknya pita (*band*) pada 173 bp (Akinola *et al.*, 2022).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

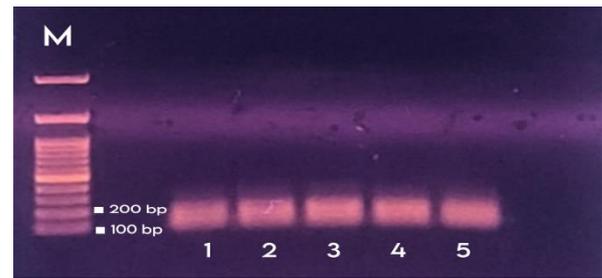
### HASIL



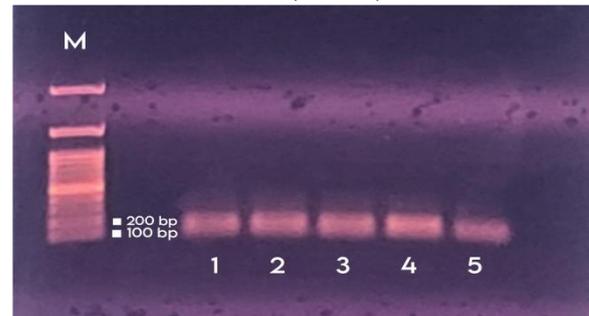
Gambar 1. Visualisasi elektroforesis hasil PCR gen *blaZ* dari sampel kode R.PG.U4 dengan konsentrasi primer 10  $\mu$ M (A) dan 5  $\mu$ M (B) diikuti variasi suhu *annealing* 54.2°C (1,4), 58.7°C (2,5), 61.8°C (3,6) dan M (Marker).



Gambar 2. Visualisasi elektroforesis hasil PCR gen *blaZ* dari sampel kode R.IGD.U5 dengan variasi suhu *annealing* 52°C (1), 54.2°C (2), 58.7°C (3), 61.8°C (4), 64°C (5) dan M (Marker).



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis hasil PCR gen *blaZ* dari sampel kode R.V.U2 dengan variasi suhu *annealing* 52°C (1), 54.2°C (2), 58.7°C (3), 61.8°C (4), 64°C (5) dan M (Marker).



Gambar 4. Visualisasi elektroforesis hasil PCR gen *blaZ* dari sampel kode R.151.U2 dengan variasi suhu *annealing* 52°C (1), 54.2°C (2), 58.7°C (3), 61.8°C (4), 64°C (5) dan M (Marker).

Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis DNA *blaZ* dengan target *band* 173 bp pada variasi suhu *annealing* 54.2°C (1,4), 58.7°C (2,5), 61.8°C (3,6). Hasil PCR dengan konsentrasi primer 10  $\mu$ M (A) menghasilkan pita (*band*) yang jelas, bersih, tebal, dan terang dibandingkan dengan konsentrasi primer 5  $\mu$ M (B) pita (*band*) terlihat lebih pudar atau samar. Gambar 2, 3 dan 4 menunjukkan pita (*band*) hasil PCR gen *blaZ* variasi suhu *annealing* 52°C (1), 54.2°C (2), 58.7°C (3), 61.8°C (4), dan 64°C (5) sesuai dengan ukuran target yaitu 173 bp. Hasil elektroforesis pita (*band*) terlihat jelas, tebal dengan panjang pita (*band*) sesuai target, dan DNA *ladder* (M) dapat terpisah dengan baik.

Hasil PCR ditentukan secara kualitatif dengan visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose. Proses elektroforesis akan memisahkan pita DNA berdasarkan berat molekul kemudian dibandingkan dengan pita penanda DNA (DNA Ladder) (Fitri *et al.*, 2021). Hasil elektroforesis yang optimal ditunjukkan dengan *band* yang bersih, tebal, dan sesuai dengan

ukuran target (Wahyudiningsih & Sartika, 2020). Berbeda dengan konsentrasi primer 5  $\mu\text{M}$ , Gambar 1 dengan kode sampel R.PG.U4 menunjukkan bahwa pada konsentrasi primer 10  $\mu\text{M}$  dapat menghasilkan pita (*band*) yang bersih, tebal, dan terang. Konsentrasi primer yang tidak mencukupi atau berlebihan dapat mencegah amplifikasi dan menyebabkan tumbukan primer dimer (*band* yang terbentuk diikuti *band* lain yang tidak spesifik) (Setyawati & Zubaidah, 2021). Berdasarkan suhu *annealing* yang digunakan *band* paling tebal, terang, dan jelas dihasilkan oleh suhu 61.8°C dibandingkan dengan suhu 54.2°C dan 58.7°C.

Deteksi gen *blaZ* dengan metode molekuler seperti PCR merupakan standar emas untuk konfirmasi  $\beta$ -laktam saat membandingkan uji fenotipik (Akinola et al., 2022). Beberapa tahapan yang terlibat dalam proses PCR yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi berulang (Yuenleni, 2019). Penelitian ini menggunakan algoritma gradien untuk melakukan variasi suhu *annealing*. Nilai  $T_m$  yang menguntungkan untuk mendeteksi gen *blaZ* pada bakteri *Staphylococcus aureus* adalah antara 52-58°C (Pratiwi et al., 2019).

Berdasarkan Gambar 2 hasil PCR dengan kode sampel R.IGD.U5 pada suhu *annealing* 58.7°C menunjukkan hasil *band* yang lebih padat dan lebih jelas dari pada suhu *annealing* 52°C, 54.2°C, 61.8°C, dan 64°C. Berdasarkan Gambar 3 hasil PCR dengan kode sampel R.V.U2 pada suhu *annealing* 61.8°C menunjukkan hasil *band* yang lebih padat dan lebih jelas dibandingkan pada suhu *annealing* 52°C, 54.2°C, 58.7°C, dan 64°C. Berdasarkan gambar 4 hasil PCR dengan kode sampel R.151.U2 pada suhu *annealing* 61.8°C menunjukkan hasil *band* yang lebih padat dan lebih jelas dibandingkan pada suhu *annealing* 52°C, 54.2°C, 58.7°C, dan 64°C.

Suhu *annealing* yang tepat dapat menghasilkan pita (*band*) yang baik saat visualisasi hasil optimasi primer dan dapat digunakan untuk mendapatkan fragmen DNA target menggunakan teknik PCR (Herman et al., 2017). Proses menempelnya primer pada DNA

template (cetakan DNA) secara signifikan dipengaruhi oleh Suhu *annealing* (Herman et al., 2018). Primer tidak akan menempel pada template dengan baik ketika suhu *annealing* terlalu tinggi, ditunjukkan dengan bertambah tipisnya *band* yang terbentuk. Sementara primer yang menempel pada titik perlekatan tidak spesifik diakibatkan karena suhu *annealing* yang terlalu rendah (Nariska et al., 2022). Hal tersebut akan menghasilkan amplifikasi fragmen lokus yang tidak sesuai dengan target, pita DNA tunggal yang tebal atau pita DNA berkerumun (tidak memisah) menunjukan DNA yang diekstraksi dalam kondisi utuh dan memiliki konsentrasi tinggi (Setyawati & Zubaidah, 2021).

## KESIMPULAN

Konsentrasi primer yang digunakan dalam mendeteksi gen *blaZ* untuk mendapatkan hasil *band* yang terlihat dengan jelas yaitu konsentrasi primer 10  $\mu\text{M}$ . Berdasarkan variasi suhu *annealing* yang digunakan, suhu *annealing* 61.8°C dapat menghasilkan *band* paling baik pada kode sampel R.PG.U4, R.V.U2, dan R.151.U2 suhu. Sedangkan kode sampel R.IGD.U5 hasil *band* paling baik pada suhu *annealing* 58.7°C.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akinola, O.T., Okedigba, I. and Elutade, O.O. (2022) 'Occurrence, antibiotic susceptibility and resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolated from keypads of automated teller machines (ATM) in a private university, Nigeria', *Scientific African*, 15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01111>.
- Anggisti, L. and Roslim, D.I. (2018) 'Optimization of annealing temperature for amplification of actin gene in pandan (*Pandanus sp.*)', *Jurnal Dinamika Pertanian*, XXXIV, pp. 95–100. Available at: <https://journal.uir.ac.id/index.php/dinamikapertanian/article/download/5411/2618/>.
- Erlin, E. et al. (2020) 'Deteksi Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Sebagai Penyebab Infeksi Nosokomial Pada Alat-Alat di Ruang Perawatan Bedah', *Quagga: Jurnal Pendidikan dan Biologi*, 12(2), p. 137. Available at: <https://doi.org/10.25134/quagga.v12i2.2671>.

- Fitri, R.R.A., Farida and Prasetyo, E. (2021) 'Perbandingan Metode PCR Konvensional Dengan Metode PCR Portable Kit Untuk Deteksi Wssv Pada Udang Vannamei', *Jurnal Ruaya: Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 9(1), pp. 54–62. Available at: <https://doi.org/10.29406/jr.v9i1.2615>.
- Halim, S.V. and Setiawan, E. (2020) 'Seftarolin, Antibiotik Baru dengan Aktivitas Anti-MRSA: Sebuah Kajian Efektivitas, Keamanan, dan Biaya Penggunaan', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(1), pp. 160–180. Available at: <https://doi.org/10.22487/j24428744.2020.v6.i1.15015>.
- Herman et al. (2017) 'Optimasi Suhu Annealing Untuk Primer g-SSR Dan EST-SSR Pada Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.)', *Jurnal Dinamika Pertanian*, XXXIII(1), pp. 95–102.
- Herman, Nainggolan, M. and Roslim, D.I. (2018) 'Optimizing Temperature Annealing for Four Primary RAPD in Mung bean (*Vigna radiata* L.)', XXXIV(Yusuf 2010), pp. 41–46.
- Hutabarat, M.S. et al. (2021) 'Aplikasi Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dalam Mendeteksi *Streptococcus pneumoniae* Menggunakan Gen Autolysin (LytA) sebagai Faktor Virulensi dari Spesimen Klinis Sputum', *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 9(2), pp. 90–98. Available at: <https://doi.org/10.22435/jbmi.v9i2.4412>.
- Nariska, H., Lestari, P. and Karima, R. (2022) 'Optimasi Metode Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism(PCR-RFLP) untuk Deteksi Polimorfisme Gen MTHFR (C677T) pada Pasien Leukemia Limfoblastik Akut (LLA)Anak', pp. 1–13.
- Pratiwi, A., Sari, R. and Apridamayanti, P. (2019) 'Optimasi suhu desain primer gen blaZ resistensi pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara in silico', *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), pp. 3–12.
- Pristianingrum, S. et al. (2021) 'Deteksi Metichilin Resistance *Staphylococcus Aureus* (MRSA)', *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*, 8(1), pp. 7–12.
- Setyawati, R. and Zubaidah, S. (2021) 'Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR)', *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), p. 36. Available at: <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>.
- Suyasa, I.B.O. and Mastra, N. (2020) 'Gambaran Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Pada Petugas Kesehatan RSUD Wangaya Kota Denpasar', *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 8(1), pp. 46–52. Available at: <https://doi.org/10.33992/m.v8i1.1074>.
- Triyaningsih, T. et al. (2022) 'Optimization of qRT-PCR Annealing Temperature of WRKY45 Gene for Detection of Resistance Genes Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Black Rice Cempo Ireng', *Jurnal ILMU DASAR*, 23(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.19184/jid.v23i1.24181>.
- Wahyudiningsih, T.S. and Sartika, D. (2020) 'Gene detection optimization of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th. using direct PCR kit', 14(2), pp. 95–101.
- Wasiati, A.R., Bimantara, A. and Anindita, N.S. (2022) 'Optimasi Dan Uji Sensitivitas Primer Polymerase Chain Reaction (PCR) Gen RNA-Dependent RNA Polymerase (RDRP) SARS-COV-2 Asal Indonesia', *Jurnal Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta [Preprint]*.
- Yuenleni, Y. (2019) 'Langkah-Langkah Optimasi Pcr', *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3), p. 51. Available at: <https://doi.org/10.22146/ijl.v1i3.48723>.
- Yustinadewi, P.D., Yustiantara, P.S. and Narayani, I. (2018) 'Mdr-I Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla', *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), p. 105. Available at: <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16>.