

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 30 sampel pasien ulkus diabetikum yang disertai pus di Rumat Spesialis Luka Diabetes Cabang Dharmahusada dan Banyu Urip, Surabaya pada bulan April 2022. Dari sampel tersebut dilakukan isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan media kultur yang spesifik dan dilanjutkan identifikasi bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) metode fenotipe dengan uji kepekaan antibiotik menggunakan *cefoxitin disk*. Setelah didapatkan koloni MRSA dilanjutkan pada deteksi gen *tst* pengkode TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*) metode genotipe menggunakan RT-PCR. Deteksi gen *tst* pengkode TSST-1 pada MRSA dari ulkus diabetikum dimulai dari ekstraksi DNA untuk mendapatkan DNA dari koloni MRSA, uji kemurnian DNA untuk mengetahui kontaminasi hasil ekstraksi DNA baik dari RNA maupun protein yang lain dan diakhiri dengan proses amplifikasi sebanyak 35 siklus menggunakan RT-PCR sekaligus pembacaan hasil analisa melalui perangkat lunak (*software*) yang sudah terhubung dengan alat.

Isolat *S. aureus* memiliki karakteristik koloni pada media agar darah berbentuk bulat dengan diameter 3 – 4 mm dan berwarna kuning ke abu-abuan yang keruh. Media disekitar koloni mengalami hemolisis sempurna ( $\beta$ -hemolisa) sehingga warna media di sekitar koloni berubah menjadi warna kuning. Sedangkan pada media *Manitol Salt Agar* (MSA), koloni dapat merfermentasi manitol dengan ditandai berubahnya warna media dari merah menjadi kuning. Bakteri ini juga memiliki enzim katalase dengan terbentuknya busa atau gelembung saat direaksikan antara koloni dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% serta enzim koagulase dengan ditandai

terbentuknya gumpalan saat direaksikan antara koloni dengan plasma sitrat. Selain itu, secara mikroskopis dengan pewarnaan gram, bakteri ini memiliki ciri ciri seperti berbentuk anggur berwarna ungu. Pada identifikasi MRSA metode fenotipe menggunakan *disk cefoxitin* 30 µg yang berperan sebagai *surrogate marker mecA mediated oxacillin resistance* atau pengganti penanda MRSA selain deteksi gen *mecA* metode genotipe menggunakan PCR. Uji daya hambat menggunakan *disk cefoxitin* memiliki sensitivitas dan spesifitas 100% yang sama dengan metode gold standar yaitu PCR (Taraferder *et al.*, 2019). *Disk cefoxitin* akan menginduksi kuat operon *mecA*, dimana gen *mecA* merupakan penyandi PBP2a yang menyebabkan *S. aureus* menjadi resisten metisilin. Adanya mutasi tersebut mengakibatkan sintesis dinding sel tidak terganggu oleh metisilin dan memiliki afinitas yang rendah terhadap antibiotik beta laktam. Hal tersebut menjadikan MRSA menjadi resisten dengan semua antibiotik golongan beta laktam (Putri *et al.*, 2015).

Dengan membandingkan hasil tabel 5.1 dan penjelasan isolasi serta identifikasi MRSA (dokumentasi sampel pada setiap media terlampir pada lampiran 3), dari 30 sampel swab ulkus diabetikum ditemukan 12 positif *S. aureus* lalu dilanjutkan dengan identifikasi MRSA yang menunjukkan 8 sampel (26,6%) terinfeksi bakteri MRSA dan 22 sampel (73,4%) tidak terinfeksi bakteri MRSA. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh penelitian oleh Sugireng dkk., pada tahun 2020 dengan hasil semua sampel yaitu 8 sampel terinfeksi oleh MRSA dan penelitian oleh Leka dkk., pada tahun 2021 menunjukkan 8 sampel terinfeksi MRSA dari 14 sampel yang terinfeksi *S. aureus*. Presentase sampel yang terinfeksi MRSA kecil dikarenakan sampel berasal dari tempat spesialis ulkus diabetikum dimana pasiennya mendapatkan perawatan khusus untuk penyembuhan ulkus

seperti pemberian antibiotik yang efektif, penggantian pembalut ulkus secara rutin dan aseptis serta secara tidak langsung dapat memantau perjalanan infeksi dari pasien ulkus diabetikum dengan baik yang bertujuan meningkatkan kesembuhannya.

Setelah identifikasi MRSA dilanjutkan dengan deteksi gen *tst* pengkode TSST-1 metode genotipe menggunakan RT-PCR, yang merupakan salah satu jenis PCR yang dapat mengetahui jumlah atau kuantitatif gen target. Pada jenis PCR ini, jumlah gen diukur dalam setiap siklus sesuai dengan pewarna berfluoresen (berpendar). Pewarna yang berfluoresen ini meningkatkan sinyal yang berbanding lurus dengan jumlah produk salinan. Data sinyal akan diproses melalui perangkat lunak (*software*) dan diterjemahkan dalam bentuk plot yang berisi akumulasi salinan selama proses PCR (Puspitaningrum *et al.*, 2018). Semakin tinggi jumlah gen target maka pewarna yang berfluoresen juga akan semakin cepat. Kuantitas gen target ditentukan berdasarkan jumlah siklus amplifikasi. Jumlah siklus amplifikasi yang dimaksud ketika pewarna berfluoresen di fase eksponensial PCR dapat melewati garis ambang fluoresensi atau *threshold*. Jumlah siklus yang diperlukan untuk melewati *threshold* disebut CT (*Cycle threshold*) (Hewajuli & Dharmayanti, 2014). Pada RT-PCR, analisa data berdasarkan siklus dengan target amplifikasi terdeteksi oleh alat atau nilai CT. Konsentrasi gen target yang tinggi akan ditandai dengan kenaikan kurva lebih awal. Oleh karena itu semakin banyak gen target dari awal reaksi maka siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai *threshold* lebih sedikit (Amallea *et al.*, 2020).

Sesuai analisa garis kurva pada gambar 5.1 dan nilai CT pada tabel 5.1, hasil deteksi gen *tst* pengkode TSST-1 dari 8 sampel positif MRSA ditemukan 7 sampel

(87%) positif gen *tst* dan 1 sampel (13%) negatif gen *tst*. Berdasarkan Puspitarini (2020), TSST-1 merupakan superantigen yang memiliki kemampuan untuk menyerang kemampuan sistem imun tubuh secara langsung. Sedangkan sampel dari penelitian ini merupakan pasien ulkus diabetikum dimana menurut Tjahjono (2020), pasien ulkus diabetikum akan mengalami penurunan sistem imun tubuh. Dari kedua pernyataan tersebut dapat disimpulkan memang terdapat hubungan terhadap terdeteksinya gen *tst* pengkode TSST-1 pada pasien ulkus diabetikum. Namun jika dilihat berdasarkan nilai CT dari sampel yang positif memiliki nilai CT yang mendekati pada nilai *threshold* dari gen *tst* pengkode TSST-1 yaitu 35. Hal tersebut berarti bahwa kuantitas gen *tst* pengkode TSST-1 rendah atau status pasien mengalami fase penyembuhan. Rendahnya kuantitas gen menunjukkan bahwa pengobatan yang didapatkan oleh pasien ulkus diabetikum di tempat spesialis luka diabetes sudah tepat. Selain itu, pemilihan metode genotipe menggunakan RT-PCR untuk deteksi gen *tst* pengkode TSST-1 dinilai tepat sesuai dengan pernyataan Amallea (2020) yaitu RT-PCR memiliki kemampuan untuk menentukan kebenaran penggunaan obat yang dapat membunuh bakteri. Hal tersebut dikarenakan alat ini dapat memonitor proses amplifikasi gen target selama proses PCR berlangsung sehingga hasil yang dikeluarkan lebih cepat dibandingkan PCR konvensional (Amallea *et al.*, 2020).

MRSA dapat menyebabkan infeksi aliran darah, saluran kemih, pernafasan, luka maupun yang disebabkan oleh *medical device*. Infeksi MRSA juga dihubungkan dengan infeksi kulit dan jaringan lunak (Boswihi & Udo, 2018 dalam Puspitarini, 2020). MRSA adalah salah satu bakteri patogen penyebab *healthcare-associated infections* (HAIs) di seluruh dunia (Santosaningsih *et al.*, 2020).

*S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik dapat meningkatkan potensi lebih tinggi untuk menimbulkan infeksi yang juga didukung oleh faktor virulensi yang dimilikinya. Salah satu faktor virulensi dari bakteri ini adalah TSST-1. TSST-1 memiliki kemampuan langsung berikatan dengan sel T tanpa melalui internalisasi oleh APC. Ikatan ini bergantung pada rantai  $\beta$ -TCR bukan antigen spesifik. Akibat dari kemampuan ini, risiko terjadinya hipersensitivitas terhadap endotoksin meningkat yang kemudian dapat merangsang pelepasan monokin dari makrofag. Keistimewaan dari toksin ini memiliki afinitas tinggi pada sel endotel yang berisiko menjadi kebocoran di kapiler, kematian sel endotel dan mengganggu celah antar sel (Dinges *et al.*, 2000 dalam Puspitarini, 2020). Selain itu toksin ini juga dapat mempertahankan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan *S. aureus* (Artursson *et al.*, 2016 dalam Larasati *et al.*, 2020). Kemampuan mempertahankan kondisi lingkungannya dikarenakan produksi TSST-1 dapat dilakukan oleh *S. aureus* secara terus menerus selama fase logaritmik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Titer puncak toksin ini terjadi setelah 48 jam inkubasi dan konstan selama 96 jam dalam aerob maupun anaerob. Meskipun faktor virulensi lain tidak diproduksi, peningkatan titer toksin tepat terjadi. Tidak ada pengaruh pH pada produksi toksin karena dapat tumbuh pada media tanpa buffer dengan pH 5,5 – 7,0 dan pH 6,7 – 7,1 tetap mengalami titer puncak toksin yang sama (Lungren *et al.*, 1997). Sehingga TSST-1 merupakan faktor virulensi yang berbahaya karena dapat menyerang imun tubuh secara langsung serta dapat mempertahankan lingkungannya agar tetap hidup.

Data atau publikasi mengenai MRSA maupun TSST-1 di Indonesia masih sangat jarang (Santosaningsih *et al.*, 2020). Oleh karena itu diharapkan adanya

pengkajian lebih jauh terhadap TSST-1 pada bakteri MRSA dari pasien ulkus diabetikum yang tidak terkontrol sehingga dapat menjadi salah bentuk tindakan pencegahan dan pengobatan terhadap faktor virulensi khususnya TSST-1 pada MRSA serta meningkatkan kewaspadaan dan derajat kesehatan bagi masyarakat.