

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel swab ulkus diabetes mellitus yang disertai pus yang diambil dari Rumat Spesialis Luka Diabetes Cabang Dharmahusada dan Banyu Urip, Surabaya pada bulan April 2022. Pada sampel tersebut selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan metode fenotipe. Setelah itu, sampel yang teridentifikasi MRSA akan dilanjutkan dengan proses ekstraksi dan uji kemurnian sebelum selanjutnya dilakukan deteksi gen *vanA*. Pada penelitian ini, deteksi gen *vanA* pengkode *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) pada isolat MRSA dilakukan secara genotipe, yaitu dengan menggunakan metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Identifikasi fenotipe MRSA diawali dengan isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan dilanjutkan dengan uji sensitifitas antibiotik dengan metode disk diffusion menggunakan cakram antibiotik cefoxitin 30 µg dengan klasifikasi isolat positif MRSA memiliki diameter zona hambat ≤ 21 mm. Isolat MRSA pada penelitian ini ditentukan dengan penggunaan cefoxitin karena lebih akurat dibandingkan oxacillin. Selain itu, Uji daya hambat menggunakan *disk cefoxitin* memiliki sensitivitas dan spesifitas 100% yang sama dengan metode gold standar yaitu PCR (Tarafder *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian ini, pada 12 isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari hasil isolasi sampel swab ulkus diabetes mellitus ditemukan 8 sampel positif MRSA.

Sebelum dilakukan deteksi gen *vanA* sampel pertama-tama dibuat suspensi untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi sampel. Tahap ekstraksi bertujuan untuk

mendapatkan larutan DNA yang akan digunakan untuk analisis RT-PCR (Sendow, 2012). Sampel yang sudah diekstraksi kemudian dilakukan uji kemurnian DNA dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran kemurnian DNA sampel berdasarkan pada rasio A260/280 berkisar antara 1,852-1,945. Standar nilai rasio A260/280 yang baik untuk DNA berkisar antara 1,8-2,0. Apabila nilainya berada dibawah atau diatas batas normal, maka kemungkinan sampel tercemar oleh protein, RNA, atau pengotor lainnya yang berasal dari sampel pada akhir larutan DNA yang dapat mempengaruhi kualitas kemurnian dari DNA (Widayat et al., 2019).

Deteksi gen *vanA* selanjutnya dilakukan secara genotipe dengan menggunakan RT-PCR. Prinsip kerja RT-PCR adalah mendeteksi dan menguantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi. Semakin banyak template pada awal reaksi, maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai titik. Saat sinyal fluoresens SYBR Green terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas (*threshold*) fluoresens yang ditentukan. Siklus saat sinyal fluoresens pertama kali meningkat melebihi threshold ini disebut threshold cycle atau disingkat Ct (Widayat et al., 2019).

Status diagnosis sampel tersebut positif atau negatif ditentukan berdasarkan nilai Ct yang diperoleh (Sendow, 2012). Nilai Ct ditentukan terutama oleh jumlah *template* yang ada di awal reaksi amplifikasi (Rahardianti & Nur, 2017). Hasil

deteksi gen *vanA* pada 8 sampel yang diperiksa ditemukan bahwa 6 sampel terdeteksi gen *vanA* dan 2 sampel tidak terdeteksi gen *vanA*. Kisaran nilai Ct dari 6 sampel yang positif yaitu 2,02-7,44. Sampel negatif yang tidak terdeteksi gen *vanA* pada penelitian ini adalah sampel dengan nilai Ct diatas 30 dan dinyatakan N/A (*Not Applicable*).

Hasil akhir deteksi gen *vanA* dari 8 sampel positif MRSA ditunjukkan oleh gambar grafik 5.1, dimana diperoleh persentase 75% untuk sampel positif dan 25% untuk sampel negatif. Pada penelitian terdahulu yang serupa pada tahun 2018 yang dilakukan oleh Mashaly dkk dengan judul “Detection of VanA type vancomycin resistance among MRSA isolates from an emergency hospital in Egypt” ditemukan 12 sampel terdeteksi gen *vanA* pengkode VRSA dari 92 isolat MRSA. Pada penelitian yang dilakukan oleh cong dkk., pada tahun 2020 tentang review kasus infeksi VRSA yang berjudul “Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features” didapatkan bahwa pada saat itu, telah dilaporkan ada 52 isolat VRSA dengan deteksi gen *vanA* menggunakan metode PCR dari penelitian terkait VRSA di beberapa negara.

Resistensi isolat MRSA terhadap antibiotik golongan glikopeptida terutama vancomycin dapat terjadi karena vancomycin adalah pilihan terapi utama untuk kasus infeksi MRSA. Selain itu, meluasnya penggunaan vancomycin dan digunakan dalam jangka waktu yang lama untuk kasus infeksi MRSA serta penggunaannya secara tidak tepat atau tidak rasional juga dapat memicu terjadinya resistensi tersebut. Mekanisme terjadinya resistensi *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) yaitu karena terjadi modifikasi pada target aksi antibiotik vankomisin adalah bagian terminal D-Ala-D-Ala dari

prekursor lipid II oleh gen *vanA*, yang seharusnya dengan bagian itu vankomisin membentuk interaksi ikatan hidrogen dan mencegah transglukosilasi dan transpeptidasi berikutnya. Namun, D-Ala–D-Lac yang dimodifikasi menyebabkan penurunan afinitas hampir 1000 kali lipat dengan vankomisin. Oleh karena itu, vankomisin kehilangan efek bakterisidalnya pada galur dengan precursor peptidoglikan yang dimodifikasi (Cong et al., 2020).

Dalam Cong et al. (2020) disebutkan infeksi VRSA saat ini masih jarang terjadi. Meskipun kejadian infeksi VRSA masih jarang dan prevalensi dari infeksi VRSA sendiri saat ini masih tidak sebesar dari MRSA, tetapi hal tersebut harus dijadikan kewaspadaan tersendiri oleh para instansi kesehatan terhadap pencegahan agar infeksi VRSA tersebut tidak meluas. Dikarenakan, infeksi oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik akan membahayakan nyawa pasien oleh karena infeksi menjadi sulit diobati dan berpengaruh pada biaya pelayanan kesehatan. Biaya kesehatan akan menjadi lebih tinggi karena kesakitan yang lebih lama dan masa juga menjadi lebih lama. Selain itu, meluasnya infeksi bakteri yang resisten terhadap banyak antibiotik menyebabkan pemeliharaan obat terapi untuk kasus infeksi bakteri semakin terbatas. (Desrini, 2015).

Hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* tidak hanya resisten terhadap antibiotik jenis methicillin tetapi juga sudah ada yang Resisten terhadap antibiotik golongan glikopeptida salah satunya adalah vankomisin. Data publikasi terkait MRSA dan VRSA di Indonesia sendiri masih sangat terbatas. Oleh karena itu dibutuhkan pengkajian lebih lanjut terhadap penggunaan antibiotik dan resistensi yang disebabkan karena penngunannya yang tidak rasional, sehingga dapat mengurangi angka risiko morbiditas dan mortalitas.