

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum *Staphylococcus aureus*

Genus Stafilocokus termasuk dalam famili *Micrococcaceae* dan merupakan bakteri kokus dengan struktur dinding sel Gram positif, tidak berflagel, non motil, tidak membentuk spora, serta tumbuh paling baik pada suasana aerob. Genus stafilocokus mempunyai sedikitnya 30 spesies, tetapi terdapat 3 spesies yang penting untuk dunia kedokteran dimana salah satunya adalah *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*).

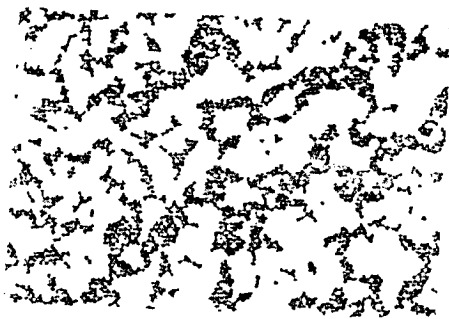
2.1.1. Morfologi

Stafilocokus berbentuk sferis, berdiameter 1 μm , berkumpul secara ireguler seperti susunan buah anggur walaupun dapat tersusun berupa kokus tunggal, berpasangan, tetrad, atau membentuk rantai.

2.1.2. Identifikasi *S.aureus*

Spesimen untuk identifikasi genus Stafilocokus dapat diperoleh antara lain dari apus permukaan, pus, darah, aspirasi trakhea, dan cairan spinal, bergantung pada lokasi proses infeksi. Bentuk khas stafilocokus dapat dilihat secara mikroskopik

dengan pewarnaan Gram (Gambar 2.1). Stafilococcus dapat tumbuh pada kebanyakan media bakteriologi dalam suasana aerob. Spesimen yang ditanam pada lempeng agar darah akan menunjukkan koloni yang khas setelah sedikitnya 18 jam pada suhu 37°C yaitu tampak bulat, mengkilat, dan halus. *S.aureus* membentuk koloni abu-abu sampai kuning emas dan dapat menghasilkan hemolisis tipe beta.



Gambar 2.1 Bentuk bakteri kokus dari preparat Stafilococcus

Prosedur identifikasi selanjutnya adalah dengan melakukan uji katalase. Uji katalase merupakan uji yang paling penting untuk membedakan Stafilococcus dari Streptokokus. Hasil yang positif dengan uji katalase kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji koagulase dengan kaca obyek dan/atau dengan tabung. Uji koagulase ini merupakan uji yang paling penting untuk membedakan *S.aureus* dengan spesies Stafilococcus lainnya.

2.1.3. Struktur Antigenik dan Faktor Virulensi

Berbagai strain *S.aureus* menghasilkan bermacam-macam faktor virulensi yang dapat dibagi menjadi 2 kategori berdasarkan lokasi seluler dan fungsinya, yaitu:

- 1) Faktor virulensi yang merupakan protein ekstraseluler seperti protein pembentuk pori-pori, enzim hidrolitik, dan toksin yang dapat menyebabkan syok pada penderita dengan bakteriemia oleh stafilokokus yang tidak terkontrol
- 2) Faktor virulensi yang merupakan struktur antigenik bakteri berupa protein-protein yang melekat pada peptidoglikan dan terpapar pada permukaan sel. Protein ini disebut juga dengan protein adhesin yang memperantarai perlekatan bakteri kepada protein darah dan protein ekstraseluler tertentu pada inang (IgG, fibrinogen, fibronectin, kolagen) (Tabel 2.1)

Tabel 2.1 Protein adhesin *S.aureus* dan target-targetnya

Adesin	Target
Fibronectin-binding protein (FnBP)	Fibronectin (komponen matriks ekstraseluler)
Protein A	Bagian Fc dari IgG
Poli-n-suksinil beta-1,6 glukosamin (PNSG)	Plastik ; kemungkinan protein dari matriks ekstraseluler
Kolagen-binding protein	Kolagen
Koagulase	Protrombin
Faktor clumping	Fibrinogen

2.1.4. Koagulase

Pada tabel 2.1 terlihat bahwa terdapat protein adhesin yang merupakan fibrinogen-binding protein dan akan memperantarai kolonisasi bakteri pada luka. *Clumping factor* akan mengenali bagian fibrinogen, sedangkan koagulase akan

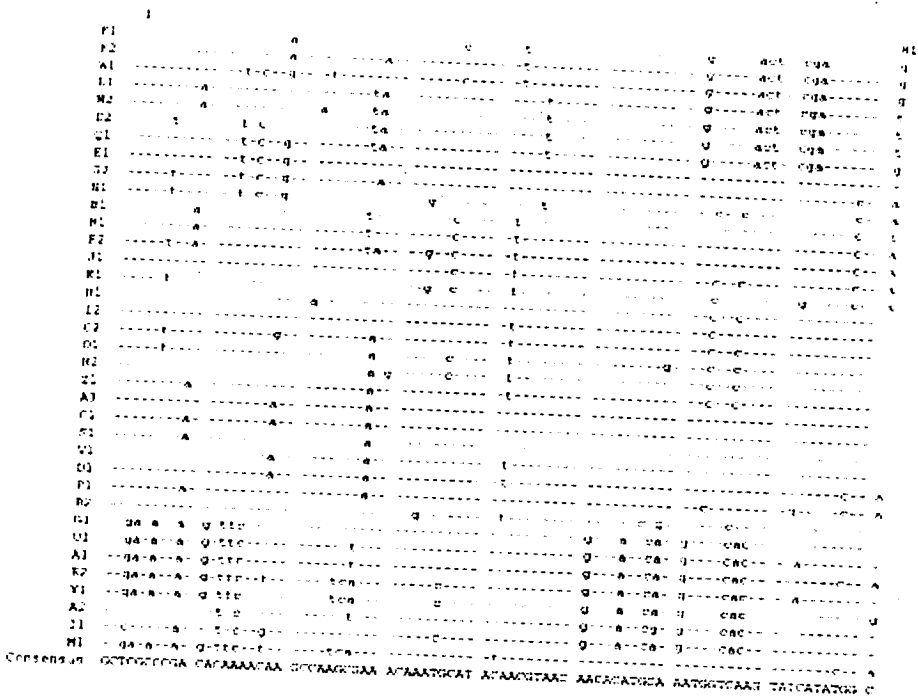
berperan sebagai faktor fibrinogen-*binding* tambahan yaitu berhubungan dengan protrombin-*binding*. Walaupun nama “koagulase” menunjukkan suatu aktivitas enzim, tetapi koagulase sebenarnya termasuk pada protein permukaan atau protein adesin penentu faktor virulensi *S.aureus*.

Koagulase akan berikatan dengan protein protrombin secara non enzimatik, dan selanjutnya bersama-sama akan aktif secara enzimatik. Kompleks ini lalu akan mencetuskan polimerisasi fibrin, perlekatan bakteri pada fibrinogen, dan akan menyebabkan darah terkoagulasi (membentuk gumpalan). Pada inang, proses ini membantu dalam perlekatan *S.aureus* ke sel-sel endotel. Hal ini merupakan prinsip dari uji koagulase dan merupakan uji yang paling penting untuk membedakan *S.aureus* dari spesies Stafilokokus lain.

2.1.5 Gen Koagulase

Koagulase atau stafikokoagulase merupakan determinan fenotipik utama untuk *S.aureus*. Gen koagulase yang merupakan gen kromosomal (gen *coa*) eksis dalam bentuk alel multipel. Berdasarkan analisis urutan DNA, berbagai bentuk alel ini disebabkan karena adanya variasi urutan nukleotida pada 3' *coding region*, yaitu berupa regio polimorfik berulang. Regio pada gen *coa* ini mengandung serial urutan DNA 81 bp berulang (urutan pendek berulang yang berdampingan / *tandem short sequence repeat* (SSR)) yang bervariasi pada jumlah dan urutannya.

Penelitian yang dilakukan oleh Shopsisin, Goh, dan kawan-kawan melaporkan bahwa berdasarkan hasil analisis sekuensing, urutan berulang ini dapat merupakan urutan yang terpelihara (*conserved*), tetapi akibat adanya variasi dari urutan nukleotidanya, maka regio ini dapat dipakai untuk membedakan berbagai isolat *S.aureus* (Gambar 2.2)



Gambar 2.2 Urutan nukleotida pada regio *coa* berulang. Garis putus-putus menunjukkan residu yang identik (Goh, 1992)

2.2. Deteksi Strain dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode amplifikasi asam nukleat target yang paling banyak digunakan saat ini adalah metode *polymerase chain reaction* (PCR). Metode ini mengkombinasikan prinsip hibridisasi asam nukleat yang komplementer dengan replikasi asam nukleat yang diaplikasikan melalui sejumlah siklus. Dengan metode ini, *copy* tunggal dari asam nukleat target, yang sering tidak terdeteksi dengan metode hibridisasi standar, dilipatgandakan menjadi 10^7 atau lebih *copy* di dalam periode yang relatif pendek.

PCR mempunyai 30 sampai 50 siklus berulang, dimana setiap siklus terdiri dari tiga reaksi yang berurutan, yaitu :

- Denaturasi asam nukleat target
- Primer *annealing* dengan asam nukleat target untai tunggal
- Pemanjangan (*extension*) dari pasangan primer-target

1) Denaturasi Asam Nukleat Target

Pada PCR, asam nukleat target harus dalam bentuk untai tunggal sehingga dapat mengadakan konformasi pada reaksi yang kedua (primer *annealing*). Mula-mula, asam nukleat target dilepaskan dari organisme dengan cara pemanasan, kimiawi, atau enzimatik. Denaturasi menjadi untai tunggal, yang tidak dilakukan pada target RNA, dilakukan pada pemanasan suhu 94°C .

2) Primer *Annealing*

Primer adalah urutan pendek dari asam nukleat (dinamakan juga oligonukleotida, biasanya mempunyai panjang 20 sampai 30 nukleotida) yang dapat berhibridisasi secara spesifik (*anneal*) dengan asam nukleat target tertentu, yang berfungsi seperti *probe*. Seperti pada uji hibridisasi, tersedianya data urutan gen menyebabkan primer spesifik bagi sejumlah mikroba patogen dan gen virulensi serta gen resistensi antibiotika, dapat dirancang dan dipesan. Jadi, rancangan urutan nukleotida primer bergantung pada target yang diujikan, seperti gen spesifik genus, gen spesifik spesies, gen virulensi, atau gen resistensi antibiotika.

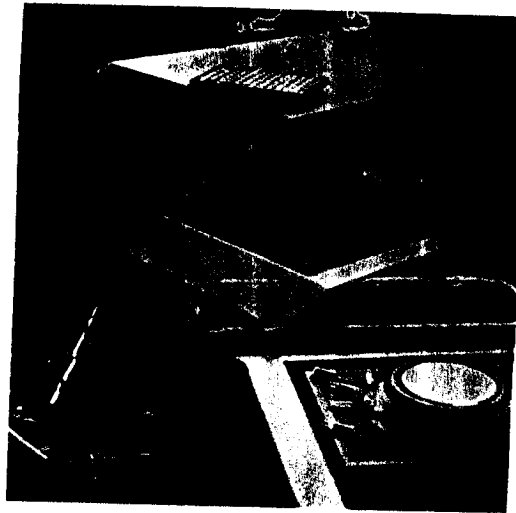
Primer dirancang dalam bentuk pasangan sehingga dapat berhibrid dengan urutan target yang diujikan. Ketika pasangan primer dicampurkan dengan DNA target yang telah terdenaturasi, satu primer akan mengadakan *anneal* dengan bagian spesifik pada salah satu ujung urutan target (primer *forward*), sedangkan primer pasangannya akan dapat mengadakan *anneal* dengan bagian spesifik pada ujung lain dari urutan target pada untai komplementer (primer *reverse*). Biasanya, primer dirancang agar jarak antaranya pada DNA target adalah 50 sampai 1000 pasang basa. Proses *annealing* ini dilakukan pada suhu 42-58°C, atau lebih.

3) Pemanjangan Pasangan Primer-Target

Annealing primer dengan urutan target membutuhkan format templat tertentu sehingga DNA polimerase dapat bekerja. Kerja enzim ini adalah menyebabkan

terjadinya penambahan nukleotida pada terminal 3' pada masing-masing primer dan terjadinya pemanjangan urutan yang komplemen dengan templat target. *Taq* polimerase adalah enzim yang sering digunakan untuk pemanjangan primer, berlangsung pada suhu 72°C. Enzim ini digunakan karena enzim ini mempunyai kemampuan untuk berfungsi secara efisien pada suhu yang tinggi (denaturasi pada suhu 94°C) dalam beberapa siklus. Kemampuan enzim ini juga menyebabkan *annealing* dan pemanjangan primer dapat terjadi pada suhu tinggi tanpa terjadinya kerusakan enzim. Enzim yang tidak rusak ini juga dapat meningkatkan kekuatan reaksi sehingga dapat mengurangi kemungkinan terjadinya amplifikasi asam nukleat yang bukan target (amplifikasi yang tidak spesifik).

Ketiga komponen reaksi pada PCR tersebut terjadi pada satu tabung yang sama dimana tabung ini mengandung campuran asam nukleat target, primer, komponen yang dapat mengoptimalkan aktivitas polimerase, seperti buffer, kation ($MgCl_2$), garam, dan deoksinukleotida. Untuk memelihara siklus reaksi agar dapat berjalan secara kontinyu, digunakan *thermocyclers* yang telah terprogram (Gambar 2.3). *Cyclers* ini dapat mengatur supaya campuran PCR dapat melalui setiap tahap reaksi pada suhu yang tepat dan pada durasi yang optimal.



Gambar 2.3 *Thermalcycler*

Produk amplifikasi spesifik dari PCR yang mengandung asam nukleat target yang diujikan disebut sebagai ampikon dan harus dapat divisualisasikan. Deteksi visualisasi ampikon ini dilakukan dengan metode pendeteksian tertentu, yaitu dengan menggunakan format larutan atau fase solid dan molekul penanda seperti radioaktif, kolorimetri, fluorometri, atau sinyal *chemiluminescent*.

Seiring dengan kemajuan teknologi PCR, pada saat ini diperlukan deteksi ampikon dalam berbagai macam ukuran. Hal ini dilakukan dengan cara menempatkan campuran PCR sesudah proses amplifikasi ke dalam gel elektroforesis. Gel diwarnai dengan ethidium bromida untuk memvisualisasikan ampikon di bawah sinar ultraviolet. Selanjutnya, ampikon dapat diinterpretasikan dalam berbagai macam ukuran dengan menggunakan marker berat atau ukuran molekul (misal dalam satuan bp).

Metode PCR dengan menggunakan gen *coa* untuk mendeteksi *S.aureus* telah dilakukan pada beberapa penelitian di luar negeri. Goh dan kawan-kawan, para ahli Mikrobiologi dan Kontrol Infeksi di Kanada, pada tahun 1992 telah melakukan penelitian dengan menggunakan regio polimorfik berulang pada gen *coa* dengan metode PCR pada 30 isolat *S.aureus*. Produk PCR didapatkan produk (pita) PCR yang bervariasi antara 440 bp sampai dengan 915 bp. Keanekaragaman panjang dan jumlah pita yang merupakan gambaran unik gen *coa* ini menyebabkan dapat dibedakannya berbagai isolat strain *S.aureus* tersebut.

2.3 Infeksi Luka Pascaoperasi oleh *S.aureus*

Infeksi luka pascaoperasi ditandai dengan adanya inflamasi, pus, dan keluaran. Infeksi luka pascaoperasi ini dapat terjadi pada semua jenis operasi sesuai dengan kriteria CDC 1988, yaitu luka bersih (*clean*), luka bersih yang terkontaminasi (*clean contaminated*), luka terkontaminasi (*contaminated*), dan luka kotor (*dirty*). Berbagai faktor predisposisi timbulnya infeksi luka pascaoperasi ini adalah :

- Lamanya perawatan sebelum operasi meningkatkan peluang pada penderita untuk terkolonisasi oleh patogen di rumah sakit yang resisten terhadap antibiotika
- Jenis dan lamanya operasi
- Adanya benda asing dan keadaan jaringan

- Selain itu, terdapat beberapa faktor predisposisi penderita akan timbulnya infeksi di rumah sakit seperti umur, imunitas spesifik, penyakit penyerta, obat-obat spesifik seperti sitotoksik dan steroid, serta trauma.

Infeksi luka pascaoperasi yang disebabkan oleh *S.aureus* dapat terjadi pada penderita setelah prosedur pembedahan atau setelah trauma. Infeksi yang terjadi dapat mengenai tulang, sendi, organ-organ dalam, dan jaringan lunak. Stafilokokus jarang menyebabkan infeksi pada orang yang imunokompeten kecuali terdapat benda asing pada lukanya, seperti jahitan atau kotoran. Infeksi ditandai dengan adanya tanda-tanda inflamasi serta adanya sekret.

Di RSHS terdapat penelitian yang mendukung *S.aureus* sebagai salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi luka pascaoperasi. Pada tahun 1989, hasil penelitian Djojogito menyatakan bahwa di bagian bedah RSHS, *S.aureus* menyebabkan infeksi luka pascaoperasi sebesar 16,5 % dari keseluruhan bakteri penyebab atau 62,9 % dari seluruh bakteri Gram positif³. Pada penelitian ini hanya dilakukan pendeteksian bakteri secara fenotipik.

Penelitian Djojogito di atas hanya mendeteksi adanya bakteri dan strain *S.aureus* dari infeksi luka pascaoperasi dengan metode fenotipik. Sedangkan metode molekuler telah diterapkan pada beberapa penelitian di luar negeri seperti telah diuraikan di atas.