

# DETEKSI GEN *pmfA* *Proteus mirabilis* PADA URIN PASIEN INFEKSI SALURAN KEMIH MENGGUNAKAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Nevi Amelia Yasmin

NPM 113216017

Program Diploma Jurusan Analis Kesehatan STIKES JENDERAL ACHMAD YANI CIMAHI

Email: neviameliasmin@yahoo.co.id

## Abstract

Urinary tract infection (UTI) is one of the most frequent nosocomial infection occurred. According to the National nosocomial infection surveillance (NNIS), the number of cases of health about 35% of all infections. *Proteus mirabilis* is one of the most important causes of urinary tract infections. This *P.mirabilis* produce fimbriae and hemagglutinin, *Proteus mirabilis* fimbriae which includes (PMF). PMF role in the pathogenesis of UTI. PMF gene cluster, which is encoded by 5655 base pair (bp) estimated that there are five polypeptides *pmfA*, *pmfC*, *pmfD*, *pmfE*, and *pmfF*. But *pmfA* gene is a gene that encodes the major fimbria of the PMF.

The method used is descriptive method. This study aims to detect the presence of *P. mirabilis* genes *pmfA* of the patient's urine UTI in the treatment room Kemuning Hasan Sadikin Hospital. The sample used is urine taken from 5 patients UTI. First inspection conducted by DNA isolation, DNA amplification receipts then PCR (Polymerase Chain Reaction) and electrophoresis.

The results of the study on the detection of gene *pmfA* *P.mirabilis* UTI urine electrophoresis using PCR of 5 samples UTI visualization is not obtained from gene *pmfA* *P.mirabilis* tape so it can be concluded that based on the results of this study concluded that the PCR was not found of genes *pmfA* *P.mirabilis* from urine of UTI patients in Hasan Sadikin Hospital.

Keywords : Urinary Tract Infection, PCR, *pmfA*

## 1. PENDAHULUAN

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan salah satu infeksi nosokomial yang paling sering terjadi (Mufida, 2008: 1). Menurut *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS), jumlah kasus kesehatan sekitar 35% dari seluruh infeksi. ISK dapat disebabkan oleh sebuah inokulum kecil bakteri karena kandung kemih hanya memiliki sedikit pertahanan terhadap bakteri patogen yang menginvasinya.

Penyebab infeksi saluran kemih yang didapat di rumah sakit ini sebagian besar *Escherichia coli*, kemudian diikuti oleh *Proteus mirabilis* (*P.mirabilis*), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, dan *Enterococcus*. Tetapi pada pasien yang menggunakan kateter, *P.mirabilis* merupakan penyebab tersering dari ISK. *P.mirabilis* termasuk dalam tribe *Proteae*, famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini sering ditemukan di tanah dan air serta merupakan

flora normal pada saluran pencernaan manusia dan mamalia.

*P.mirabilis* merupakan salah satu penyebab terpenting infeksi saluran kemih, karena infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini bersifat persisten, sulit diterapi dan dapat berakibat fatal. *P.mirabilis* menghasilkan urease yang memecah urea menjadi ammonia dan karbondioksida yang akan meningkatkan pH urin, pH yang meningkat maka presipitasi komponen urin ( $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$ ) menjadi lebih mudah sehingga menimbulkan terbentuknya batu. Selain itu dengan adanya batu dan infeksi secara bersamaan akan mengakibatkan kerusakan ginjal, baik akut maupun kronik pyelonephritis dan juga dapat menimbulkan bacteremia.

*P.mirabilis* ini menghasilkan fimbriae dan hemagglutinin, yang meliputi hemagglutinin *mannose resistant Proteus* (MR/P), hemagglutinin *mannose resistant Klebsiella* (MR/K), *uroepithelial cell adhesin* (UCA) dan *Proteus mirabilis fimbriae*

(PMF). PMF berperan dalam pathogenesis ISK. Selama infeksi, PMF lebih berkontribusi dan signifikan terhadap daya virulensi *P.mirabilis*. Gen PMF ini ditemukan disemua strain *P.mirabilis*. Dikemukakan bahwa PMF bisa berperan dalam kolonisasi kandung kemih. *Cluster* gen PMF, yang dikodekan oleh 5655 base pair (bp) yang diperkirakan terdapat lima polipeptida yaitu *pmfA*, *pmfC*, *pmfD*, *pmfE*, dan Gen *pmfA* merupakan gen yang mengkodekan fimbria utama dari PMF. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen *pmfA* *Proteus mirabilis* dari urin pasien ISK di RSHS Bandung.

## 2. METODE PENELITIAN

Bahan isolate bakteri *P.mirabilis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *P.mirabilis* hasil kultur yang diperoleh dari Biofarma, Bandung. Untuk keperluan isolasi DNA, isolasi DNA bakteri ditumbuhkan pada medium LB, suhu 37°C selama 24 jam. Sentrifugasi 3500 rpm selama 3 menit kemudian sedimen dipanaskan pada waterbath suhu 90 °C selama 10 menit. Isolate kemudian dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi dan presipitasi. Pelet sel disuspensikan dalam 50 µl ddH<sub>2</sub>O steril panaskan dengan suhu 95°C selama 15 menit kemudian Sentrifugasi 10.000 rpm 10 menit.

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dari *P.mirabilis*. reaksi PCR dilakukan dengan campuran 13,75 µl ddH<sub>2</sub>O, 2,5 µl Buffer PCR 10x, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl Primer *forward*, 0,5 µl Primer *reverse*, 0,5 µl dNTP, 0,25 µl *Taq* DNA Polimerase dan 5 µl Template (DNA *P.mirabilis*). Primer yang digunakan primer forward (5-ATG AAA CTG AAA ATT GCT TTG GCT G-3) dan primer reverse (5-GGC GCG GCC GCA ATA TGA TTA CTG ATA AT-3). Reaksi PCR yang dilakukan menggunakan 30 siklus, yang tiap siklusnya terdiri dari: (1) suhu denaturasi 94°C sehingga DNA untai ganda terdenaturasi menjadi dua untai tunggal (2) suhu annealing atau suhu penempelan 58°C pada langkah ini primer akan menempel pada DNA target dan (3) suhu elongasi atau suhu pemanjangan 72°C pada langkah ini terjadi

proses sintesis yang telah dimulai dari tempat penempelan primer.

Analisis amplifikasi DNA, dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose. Lempeng agarose dibuat dengan cara menimbang agarose 0,6 gram dan dilarutkan kedalam buffer TAE sebanyak 40 ml. Setelah mendidih, dinginkan hingga suhu sekitar 8°C dan tambahkan etidium bromide sebagai marker DNA. Sejumlah 20 µl larutan DNA dan larutan loading dye (5:1) dimasukkan kedalam sumuran yang terdapat dalam lempeng agarose yang sudah terendam buffer TAE. Elektroforesis dilakukan menggunakan tegangan 50 Volt selama 30 menit. penambilaan gambar dilakukan dengan kamera dibawah sinar ultraviolet diatas transilluminator.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler STIKES Jenderal Achmad Yani Cimahi Jurusan Analisis Kesehatan. Pada bulan April sampai dengan Agustus 2014. Populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 14 urin pasien ISK yang dirawat inap di ruang kemuning RSHS Bandung selama bulan April sampai bulan Juni 2014. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin dari 5 pasien ISK yang dirawat inap di ruang kemuning RSHS Bandung.

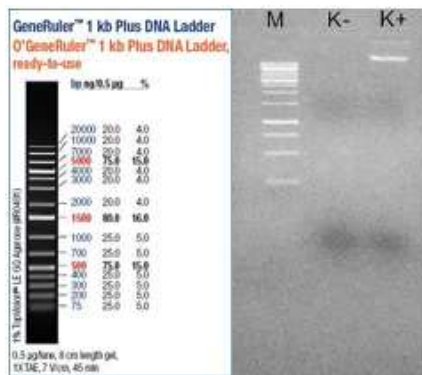
## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan yaitu urin pagi. Isolasi DNA pada penelitian ini dikerjakan dengan hati-hati karena DNA sangat mudah rusak oleh enzim DNase yang terdapat pada kulit, saliva maupun air mata pemeriksa. Oleh karena itu selama pengerjaan harus menggunakan sarung tangan dan berbicara sesedikit mungkin. Metode ekstraksi DNA dengan thermal lysis merupakan metode ekstraksi yang menggunakan suhu panas pada proses pemecahan selnya. Penggunaan suhu tinggi ini bertujuan untuk memaksimalkan pemecahan sel pada suhu 99°C, dengan waktu yang relatif singkat yaitu 2 menit agar DNA tidak mengalami. Ada sejumlah keuntungan yang ditemukan dari isolasi DNA urin untuk diagnostik, faktanya

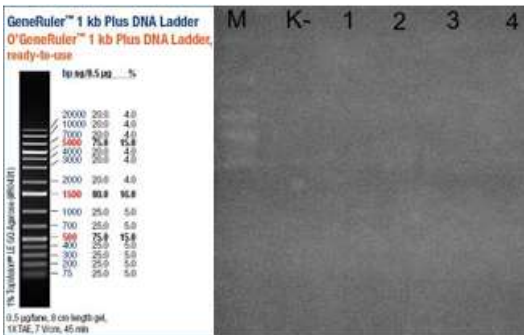
pada saat pengumpulan sampel urin benar-benar non



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Isolasi DNA 5 Sampel pasien ISK



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Kontrol Positif



Gambar. Hasil Elektroforesis Produk PCR 5 sampel pasien ISK

Invasive dan secara teknis isolasi DNA dari urin lebih mudah dari pada dari darah karena urin mengandung rendah protein. Namun metode untuk isolasi DNA dari urin memiliki sejumlah kelemahan, yang pertama pemeriksaannya cukup lama dan yang kedua urin yang diperlukan dalam volume yang banyak sedangkan hanya sedikit DNA yang. DNA dapat ditemukan baik pada kromosom inti maupun pada organel. Proses pengeluaran DNA dari nukleus biasanya

dilakukan dengan homogenisasi dengan penambahan buffer lisis untuk mencegah DNA rusak, pada penelitian ini menggunakan ddH<sub>2</sub>O yang berfungsi sebagai pelarut DNA.

Hasil isolasi DNA diperlihatkan dengan elektroforesis pada gel agarosa Gambar 4.1. Dari hasil isolasi DNA yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis menunjukkan pita DNA sampel nomer 4 tampak *smear* jadi isolasi DNA ini mendapatkan DNA yang belum benar-benar murni. Nilai Kemurnian DNA yang rendah disebabkan karena metode ekstraksi dengan thermal lysis memotong proses isolasi dengan tidak melibatkan tahap pemurnian dan pencucian DNA pada proses isolasinya. Tahap pemurnian DNA dapat menghasilkan DNA yang bebas dari pengotor. Sedangkan tahap pencucian DNA dengan penambahan etanol dapat mengendapkan DNA karena asam nukleat akan mengendap dan sukar larut dalam etanol sedangkan pengotor dapat larut dalam etanol. Sehingga hasil kualitas DNA dengan elektroforesis menunjukkan adanya *smear*. Untuk sampel nomer 1,2,3 dan 5 tidak berhasil dilakukan isolasi DNA, hal ini dikarenakan sampel urin mempunyai volume yang kurang. Dimana menurut Abdalla volume yang banyak sedangkan hanya sedikit DNA yang terisolasi.

Diagnosis laboratorium yang cepat dan akurat sangat diperlukan untuk menunjang diagnosis klinis ISK. Teknik PCR memiliki beberapa keuntungan yaitu lebih cepat, sederhana dan mudah diinterpretasi. Teknik PCR sangat bermanfaat untuk skrining dan untuk konfirmasi laboratorium terutama pada saat terjadi wabah. Sedangkan kelemahannya teknik PCR juga tidak dapat memberi informasi kerusakan atau mutasi gen structural.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap 5 sampel urin pagi penderita ISK, tidak didapatkan produk hasil amplifikasi PCR. Hal ini disebabkan berkaitan dengan isolasi DNA yang dihasilkan. Menurut Ahmed kondisi optimal pada proses PCR dalam penelitian dipengaruhi oleh komponen reaksi PCR konsentrasi primer, spesifisitas primer dan jumlah siklus PCR. Pada

penelitian ini konsentrasi primer yaitu 0,4  $\mu\text{M}$ . Menurut Czerny dan Henegariu konsentrasi primer untuk menghasilkan produk PCR yang baik sebesar 0,1-1  $\mu\text{M}$ . Konsentrasi primer yang lebih dari 1  $\mu\text{M}$  akan menyebabkan primer tersebut menempel pada sekuen yang tidak diinginkan, sedangkan konsentrasi primer yang lebih rendah menyebabkan proses PCR tidak berjalan efisien dan menghasilkan produk PCR dengan kuantitas yang sedikit.

Spesifitas primer menentukan keberhasilan proses PCR. Spesifisitas merupakan kemampuan primer untuk menempel pada sekuen target. Penempelan primer pada sekuen target dipengaruhi suhu *annealing*. Sebaiknya  $T_m$  primer berkisar antara 50-65°C. Suhu yang tepat dapat meminimalkan pelekatan primer pada sekuen nonspesifik dan meningkatkan jumlah produk PCR spesifik.

Jumlah siklus PCR juga menentukan spesifisitas produk PCR. Proses amplifikasi fragmen gen *pmfA* menggunakan 30 siklus. Hal tersebut bertujuan untuk memperoleh kuantitas produk PCR yang lebih besar. Jumlah siklus yang digunakan masih berada pada kisaran jumlah siklus optimal untuk proses PCR, yaitu 25-45 siklus. Jumlah siklus yang terlalu banyak dapat mengurangi aktivitas primer, dNTP dan *Taq* polymerase sehingga produk PCR tidak spesifik. Jumlah siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan.

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tidak ditemukan gen *pmfA* *Proteus mirabilis* dari urin pasien infeksi saluran kemih di Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.

#### 5. REFERENSI

Abdalla, M., Bibby, E., Roberts, P., & Ahmad, Y. H. (2006). *Isolation of DNA from as little as 25  $\mu\text{l}$  of Urine Using Norgen's Urine DNA Isolation Kit*.

Faatih, M. (2009). Jurnal penelitian sains & teknologi . *Isolasi dan Digesti DNA Kromosom*, 10.

Fatchiyah, Arumingtyas , E. L., Widyarti, S. & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Rina Askitawati ed. Jakarta: Erlangga.

Gales, A. C. et al. (2000). *Activity And Spectrum Of 22 Antimicrobial Agent Tested Against Urinary Tract Infection Pathogens In Hospitalized Patients In Latin America: report from the second year of the sentry antimicrobial surveillance program (1998)*. *antimicrobial chemotherapy*.

Gould, D. & Brooker , c. (2003). *Mikrobiologi Terapan Untuk Perawat*. Jakarta : EGC.

Handayani, S. (2012). *Deteksi Kuman Difteri dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). *Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Manos, J. & Belas , R.(2006). *The Genera Proteus, Providencia, and Morganella. Prokaryotes*.

Massad, G., Lockatell, C. V., Johnson, D. E. & Mobley, H. L. (1994). *Proteus Mirabilis Fimbriae Construction Of An Isogenic PmfA Mutant And Analysis Of Virulencein A CBA Mouse Model Of Ascending Urinary Tract Infection. Infection and Immunity*.

Michelim, L. et al. (2008). *Comparasion Of Pcr-Based Molecular Markers For The Characterization Of Proteus Mirabilis Clinical Isolates. The brazilian journal of infectious disease*.

- Mufida, D. C. (2008). *Identifikasi Protein Hemagglutinin Pili Proteus Mirabilis P 355*. JKM .
- Mufida, D. C. & Suswati, E. (2007). *Protein Hemagglutinin 35,2 kda Pili Proteus Mirabilis P355 sebagai Adhesin pada Epitel Vesika Urinaria Kelinci*. ILMU DASAR.
- Mufida, D. C., Suswati, E., Wahyudi, S. S. & Kurniawan, A. (2010). *45 Kda Fimbria Protein Of Proteus Mirabilis As Hemagglutinin And Adhesion Protein. folia medica indonesia*, Volume 46.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2011). *Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas (Cyprinus carpio L.)*.
- Nakazono, T. et al. (2005). *Successful DNA typing of urine stains using a DNA purification kit following dialfiltration. Journal of forensic sciences*, July, Volume 50.
- Nielubowicz, G. R. & Mobley, H. L. T. (2010). *Host Pathogen Interaction In Urinary Tract Infection. nature reviews*, Volume 7.
- Novel, S. S., Safitri, R., Harijanto, S. H. & Nuswantara, S., (2011). *Perbandingan Beberapa Metode Molekuler dalam Uji DNA HPV (Human Papillomavirus)*. *Teknik*, Volume 38.
- Prayuni, K. (2008). *Isolasi dan Pengklonaan Promoter Gen lea3 yang Terinduksi Kekeringan dari Tanaman Padi (Oryza Sativa L.) Lokal Indonesia Kultivar Rojolele dan Batutegi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Putra, S. T. (1999). *Biologi Molekuler Kedokteran*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Ray, P. H., & Brock, T. D. (1971). *Thermal Lysis of Bacterial Membranes and Its Prevention by Polyamines*. *Journal of General Microbiology*.
- Siregar, T. H., Elliman, J. & Owens, L. (2012). *Pengembangan Real Time Pcr Untuk Mendeteksi Keberadaan Salmonella Tyhpimurium Dan Salmonella Enteriditis Pada Ikan*. *Development Of Real Time Polymerase Chain Reaction*, Volume 7.
- Sudjadi (2008). *Teknik Biologi Molekuler. In: Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Susilaningsih, N., Karjono, B. J. & Purnawati, R. D. (2012). *Production Of Tumor Necrosis Factor-A Is Increased In Urinary Tract Infections*. *universa medicina*.
- Taylor, & Francis. (2011). *Molecular Detection Of Human Bacterial Phatogens*. (D. Liu, Ed.) U.S.: CRC press.
- Vandepitte, J. et al. (2002). *Urin*. In: D. Susanto, ed. *Prosedur Laboraturium Dasar*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Yuwono, T. (2005). *Metode-Metode Dasar Yang Digunakan Dalam Biologi Molekuler*. In: A. Safitri, ed. *Biologi molekuler*. Yogyakarta: Erlangga.
- Zunino, P. et al. (2003). *Proteus Mirabilis Fimbriae (PMF) Are Important For Both Bladder And Kidney Colonization In Mice*. *Microbiology*.