

Kondisi optimal PCR untuk mendeteksi gen *FimH* isolat klinis *Escherichia coli* penyebab infeksi saluran kemih



CrossMark

Prisela Zharaswati,^{1*} Ni Nyoman Sri Budayanti,² Ni Nengah Dwi Fatmawati²

ABSTRACT

Background: Urinary tract infection is one of the most common infectious diseases and the second most common infection after respiratory tract infection. Bacteria are the most common cause of urinary tract infections in more than 95% of cases. *Escherichia coli* is the most common bacteria that found in 80-90% of cases of urinary tract infection. The critical virulence factor of *Escherichia coli* is the type 1 fimbriae with the adhesion subunit, *fimH*, plays an essential role in the pathogenesis of urinary tract infection.

Aim: The research aims to obtain the optimal condition of PCR in detecting the *fimH* gene with modification of *annealing* temperature in the PCR process.

Method: This study used a sample of *fimH* DNA genes from clinical isolates of *E. coli* causing UTI. The second PCR used an annealing temperature of 57°C and a third PCR using an annealing temperature of 64°C. The electrophoresis results are then viewed with an ultraviolet transilluminator.

Result: The optimization finding showed that the *annealing* temperature of 52 °C, 57 °C, and 64°C could detect the *fimH* gene where the higher the temperature used by T_m , the less the specificity produced.

Conclusion: The optimum annealing temperature of PCR to identify the *fimH* gene from *E. coli* causes the UTI is in the temperature of 64°C with better specificity than of 52°C. The annealing temperature of 64°C indicates the lowest specificity.

Keywords: *fimH*, PCR, *Escherichia coli*, urinary tract infections

Cite This Article: Zharaswati, P., Budayanti, N.N.S., Fatmawati, N.N.D. 2019. Kondisi optimal PCR untuk mendeteksi gen *FimH* isolat klinis *Escherichia coli* penyebab infeksi saluran kemih. *Intisari Sains Medis* 10(2): 220-222. DOI: 10.15562/ism.v10i2.236

ABSTRAK

Infeksi saluran kemih merupakan salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi dan tergolong infeksi kedua terbanyak setelah infeksi saluran pernapasan. Bakteri merupakan penyebab paling banyak pada kejadian infeksi saluran kemih yaitu lebih dari 95% kasus. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang paling banyak ditemukan pada kasus infeksi saluran kemih yaitu 80-90% kasus. Faktor virulensi yang berperan penting dari *Escherichia coli* adalah fimbriae tipe 1 dengan subunit adhesi, *fimH*, memiliki peranan penting dalam patogenesis infeksi saluran kemih.

Tujuan: Untuk mendapatkan kondisi optimal PCR dalam mendeteksi gen *fimH* dengan modifikasi suhu *annealing* dalam proses PCR. Metode: Penelitian ini menggunakan sampel berupa

DNA gen *fimH* dari isolat klinis *E. coli* penyebab ISK. PCR kedua menggunakan suhu *annealing* 57 dan PCR ketiga menggunakan suhu *annealing* 64. Hasil elektroforesis kemudian dilihat dengan *transiluminator ultra violet*.

Hasil: Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* 52°C, 57°C, dan 64°C dapat mendeteksi gen *fimH* dimana semakin tinggi suhu yang digunakan berdasarkan T_m , semakin berkurang spesifitas yang dihasilkan.

Simpulan: Suhu *annealing* optimal PCR untuk mendeteksi gen *fimH* dari *E. coli* penyebab ISK adalah pada suhu 64°C dengan spesifitas yang lebih baik daripada suhu *annealing* 52°C. Suhu *annealing* 64°C menunjukkan spesifitas yang paling rendah.

Kata kunci: *fimH*, PCR, *Escherichia coli*, infeksi saluran kemih

Cite Pasal Ini: Zharaswati, P., Budayanti, N.N.S., Fatmawati, N.N.D. 2019. Kondisi optimal PCR untuk mendeteksi gen *FimH* isolat klinis *Escherichia coli* penyebab infeksi saluran kemih. *Intisari Sains Medis* 10(2): 220-222. DOI: 10.15562/ism.v10i2.236

PENDAHULUAN

Infeksi saluran kemih merupakan salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi dan tergolong infeksi kedua terbanyak setelah infeksi saluran pernapasan.¹ Penyakit ini dapat diderita oleh laki laki maupun perempuan dan dapat diderita oleh semua umur.² Berdasarkan data WHO, sebanyak

50% perempuan pernah mengalami infeksi saluran kemih selama hidupnya dengan 8,3 juta kunjungan dan 1 juta pasien masuk rumah sakit.³

Infeksi saluran kemih dapat disebabkan oleh bakteri, fungi, atau parasit. Namun, bakteri merupakan penyebab paling banyak pada

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

*Correspondence to:

Prisela Zharaswati, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana
zprisel@gmail.com

Diterima: 08-04-2018
Disetujui: 18-07-2018
Diterbitkan: 01-08-2019

kejadian infeksi saluran kemih yaitu lebih dari 95% kasus.⁴ Bakteri-bakteri yang dapat menyebabkan infeksi saluran kemih adalah *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, spesies *Enterobacter*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* dan spesies *Pseudomonas*.¹ Dari bakteri tersebut, *Escherichia coli* merupakan bakteri yang paling banyak ditemukan pada kasus infeksi saluran kemih yaitu 80-90% kasus.² *Escherichia coli* yang berhubungan dengan infeksi saluran kemih biasa disebut *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC). UPEC merupakan bakteri batang gram negatif yang berasal dari saluran gastrointestinal yang dapat menuju ke vagina dan periuretra yang dapat bergerak naik ke uretra, kandung kemih, bahkan dapat berkolonisasi di ginjal.⁵

Kemampuan *E.coli* untuk menyebabkan infeksi saluran kemih berhubungan erat dengan adanya faktor virulensi yang berkaitan dengan kolonisasi, persistensi, dan patogenesis dari ISK.⁶ Bagian terpenting dari faktor virulensi ini termasuk adhesin atau fimbriae, pembentukan biofilm, dan toksin.⁷ Faktor virulensi yang berperan penting dari *E.coli* penyebab ISK adalah fimbriae tipe 1 yang merupakan faktor virulensi terbanyak pada kejadian infeksi saluran kemih.^{7,8,9}

Kemampuan *E.coli* untuk menyebabkan infeksi saluran kemih yang berhubungan dengan faktor virulensi khususnya fimbriae tipe 1 dengan subunit adhesi, fimH, merupakan bagian yang paling penting dalam patogenesis infeksi saluran kemih. Hal ini berhubungan dengan gejala klinis dan rencana terapi bagi penderita infeksi saluran kemih sehingga dapat menurunkan morbiditas maupun mortalitas dari infeksi saluran kemih yang diakibatkan oleh bakteri *Escherichia coli*.

Untuk mendeteksi gen fimH pada *Escherichia coli* penyebab infeksi saluran kemih, dapat dilakukan dengan menggunakan teknik molekuler yaitu PCR. Kondisi optimal PCR sangat mempengaruhi tingkat keakuratan hasil PCR termasuk dalam mendeteksi gen fimH. Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi optimal dalam mendeteksi gen fimH dari *E.coli* penyebab ISK.

METODE

Penelitian ini menggunakan sampel berupa DNA gen fimH dari isolat klinis *E.coli* penyebab ISK. DNA template untuk amplifikasi PCR didapatkan dengan metode *boiling* yang kemudian diambil supernatannya. Sekuens dari primer yaitu primer fimH (F): 5'-GTG CCA ATT CCT CTT ACC GTT-3' dan primer fimH (R): 5'-TGG AAT AAT

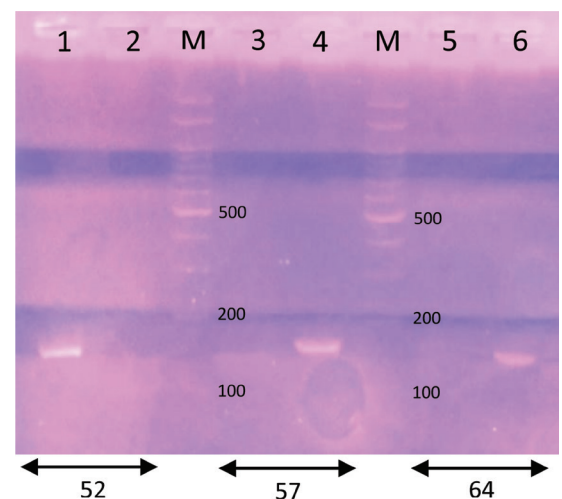
CGT ACC GTT GCG-3'.¹⁰ Volume total PCR mix adalah 10 yang mengandung 5 *Promega Master Mix*, 0,3 primer fimH(F) (0,3 M) 0,3 primer fimH(R) (0,3 M), 3,6 H₂O, dan 0,8 DNA template. Proses elektroforesis memakai gel agarosa 2%, TBE 1x dan DNA ladder 100 bp.

Proses PCR terdiri dari tahap pra denaturasi suhu dalam 2 menit, denaturasi suhu dalam 1 menit, *annealing* dalam 45 detik dengan suhu 52, dan *extension* suhu selama 1 menit, *final extension* suhu selama 5 menit. Siklus diulang sebanyak 35 kali. PCR kedua menggunakan suhu *annealing* 57 dan PCR ketiga menggunakan suhu *annealing* 64.

Elektroforesis dilakukan dengan bubuk agarose 2% dalam TBE 1x yang ditambahkan dengan Gelred 1. Elektroforesis kemudian dijalankan dengan TBE 0,5x dengan tegangan 100 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian dilihat dengan *transilluminator ultra violet*.

HASIL

Gambar 1 menunjukkan hasil PCR dengan perbedaan suhu *annealing*. Kolom 1 (sampel) dan kolom 2 (kontrol negatif) pada suhu *annealing* 52°C, kolom 3 (kontrol negatif) dan kolom 4 (sampel) pada suhu *annealing* 57°C, kolom 5 (kontrol negatif) dan kolom 6 (sampel) pada suhu *annealing* 64°C, dan M sebagai Marker DNA ladder 100bp. Hasil menunjukkan bahwa ketiga suhu *annealing* yang digunakan dapat mendeteksi gen fimH seperti ditunjukkan pada **gambar 1** kolom 1, 4, dan 6 dengan ukuran 164 bp yakni berada di antara 200 dan 100. Kolom 2, 3, dan 5 (kontrol negatif) tidak terlihat pita pada hasil PCR.



Gambar 1 Hasil PCR berdasarkan optimalisasi suhu *annealing*

DISKUSI

Hasil menunjukkan bahwa pada tiga suhu annealing yang digunakan, dihasilkan pita fragmen DNA. Namun, hasil pita yang terbentuk menunjukkan adanya perbedaan spesifitas yang ditunjukkan pada perbedaan ketebalan pita. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan perlakuan pada sampel yakni perbedaan suhu annealing yang digunakan sehingga mempengaruhi hasil dari amplifikasi. Tm primer menjadi dasar dalam pemilihan suhu annealing. Berdasarkan perhitungan Tm dengan rumus; $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ didapatkan Tm primer F sebesar 62°C dan Tm primer R sebesar 62°C. Suhu annealing yang digunakan umumnya 10°C-5°C dibawah Tm primer sehingga suhu yang digunakan yaitu 52°C-57°C. Adapun penggunaan suhu annealing 64°C sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hohjati (2015).¹⁰ Pada kondisi suhu annealing 52°C, 57°C, dan 64°C terbentuk pita berukuran 164 bp yakni berada di antara 200 bp dan 100 bp. Namun, terdapat perbedaan spesifitas di antara produk PCR tersebut dimana pada produk PCR dengan suhu annealing 52°C memiliki spesifitas yang lebih tinggi diantara produk PCR dengan suhu annealing yang lain, diikuti dengan produk PCR pada suhu annealing 57°C, lalu pada produk PCR dengan suhu 64°C memiliki spesifitas yang lebih rendah dibanding produk PCR dengan suhu annealing yang sebelumnya. Hal ini dapat dilihat dari ketebalan pita dimana ketebalan pita yang dihasilkan semakin berkurang ketebalannya seiring dengan peningkatan suhu annealing yang digunakan. Penggunaan suhu annealing yang lebih tinggi menyebabkan terjadinya penurunan spesifitas akibat terhambatnya hibridisasi template sehingga primer tidak dapat menempel dengan baik pada DNA target yang menghasilkan spesifitas produk PCR yang lebih rendah seperti yang ditunjukkan pada gambar 1.

Pada kolom 2, 3, dan 5 dengan suhu annealing 52°C, 57°C, dan 64°C merupakan kontrol negatif sehingga tidak terbentuk pita. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu annealing yang digunakan berdasarkan rumus Tm, maka semakin berkurang spesifitas produk PCR yang dihasilkan.

SIMPULAN

Suhu annealing optimal PCR untuk mendeteksi gen fimH dari E.coli penyebab ISK didapatkan pada suhu annealing 52°C, 57°C, dan 64°C dengan spesifitas yang lebih baik pada suhu annealing 52°C. Suhu annealing 64°C menunjukkan spesifitas yang paling rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Hotchandani R and Aggarwal KK. Urinary Tract Infections in Women. *Ind J Clin Practice*. 2012;187-192.
- Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. Phylogenetic groups of Escherichia coli strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation. 2015: 5-11.
- World Health Organization. Cauda UTI - ECCMID Dec 2011DEFppt. http://www.who.int/gpsc/information_centre/cauda-uti_eccmid.pdf?ua=1 (Akses: 30 April 2018).
- Daoud Z, Afif C. Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2000 and 2009: Epidemiology and Profiles of Resistance. *Chemother Res Pract*. 2011; 1-6.
- Rogers EMC, Peterson ND, Hilbert DW. Uropathogenic Escherichia coli: the pre-eminent urinary tract infection pathogen; 2011: 1-66 p.
- Minardi D, d'Anzeo G, Cantoro D, Conti A, Muzzonigro G. Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *Int J Gen Med*. 2011;4:333-43.
- Tabasi M, Reza M, Karam A, Habibi M. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. *Osong Public Heal Res Perspect*. Elsevier Korea LLC; 2015;6(4):261-8.
- Tiba MR, Yano T, Leite DDS. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(5):255-60.
- Slavchev G, Pisareva E, Markova N. Virulence of Uropathogenic Escherichia Coli. *J Cult Collect*. 2008;6:3-9.
- Hojati Z, Molaie R, Gholipour A. The FimH Gene in Uropathogenic Escherichiacoli Strains Isolated From Patient With Urinary Tract Infection. *Jundishapur J Microbiol [Internet]*. 2015;8(2):12-5.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution