

Deteksi Gen *fimH* Pada Sampel Urin Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Fitria Diniyah Janah Sayekti*

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Teknologi Laboratorium Medis
fitria.diniyah@stikesnas.ac.id

Mastuti Widi Lestari²

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Teknologi Laboratorium Medis
Mastuti.widi@stikesnas.ac.id

Dahlan Sitohang³

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Teknologi Laboratorium Medis
sitohangdahlan@stikesnas.ac.id

**Corresponding author*

ABSTRAK

Ginjal berperan dalam menjaga homeostatis cara membuang kelebihan H₂O dan elektrolit melalui urin. Sistem saluran urin dari individu sehat normalnya steril. Adanya bakteri dalam sedimen urin menandakan terjadinya kontaminasi atau adanya infeksi saluran kemih. Keberadaan mikroorganisme dalam urin dapat disebabkan juga oleh mikroorganisme yang masuk kedalam saluran kemih serta berkembang biak didalam saluran kemih tersebut. Penyebab patogen yang paling umum adalah bakteri *Escherichia coli*. Kemampuan *Escherichia coli* untuk menyebabkan infeksi saluran kemih yang berhubungan dengan faktor virulensi khususnya *fimbrae* tipe 1 dengan subunit adhesi (*fimH*). Gen *FirmH* merupakan bagian yang paling penting dalam patogenesis infeksi saluran kemih. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen *FirmH E.coli* pada sampel urin dengan metode *polymerase chain reaction*. Sampel urin diperoleh dari mahasiswa yang tidak mengalami gejala penyakit apapun. Isolasi DNA bakteri didapatkan dari sampel urin dan semua isolat DNA dapat tervisualisasi pada gel elektroforesis. Dari pemeriksaan amplifikasi PCR dapat diketahui bahwa terdapat gen *fimH* yang tervisualisasi pada 164 bp pada 9 sampel yang menjadi penanda keberadaan *Escherichia coli* dan 1 sampel yang negatif.

Kata Kunci: *FirmH, E.coli, Urin*

ABSTRACT

The kidneys play a role in maintaining homeostasis by removing excess H₂O and electrolytes through urine. The urinary tract system of healthy individuals is normally sterile. The presence of bacteria in urine sediment indicates contamination or urinary tract infection. The presence of microorganisms in urine can also be caused by microorganisms that enter the urinary tract and multiply in the urinary tract. The most common pathogenic cause is *Escherichia coli* bacteria. The ability of *Escherichia coli* to cause urinary tract infections is associated with virulence factors, especially type 1 *fimbrae* with adhesion subunits (*FimH*). The *FirmH* gene is the most important part in the pathogenesis of urinary tract infections. This study aims to determine the presence of the *E. coli FirmH* gene in urine samples using the *polymerase chain reaction* method. Urine samples were obtained from students who did not experience any symptoms of the disease. Bacterial DNA isolation was obtained from urine samples and all DNA isolates could be visualized on gel electrophoresis. From the PCR amplification examination, it can be seen that there is a *fimH* gene visualized at 164 bp in 9 samples which are markers of the presence of *Escherichia coli* and 1 negative sample.

Keywords: *FirmH, E.coli, Urine*

PENDAHULUAN

Pada saluran kemih yang normal tidak

dihuni oleh bakteri aerob atau mikroba yang lain, karena urin dalam ginjal dan buli-buli biasanya steril. Walaupun demikian uretra bagian bawah terutama pada wanita dapat dihuni oleh bakteri yang jumlahnya makin kurang pada bagian yang mendekati kandung kemih. *Escherichia coli* menduduki persentasi biakan paling tinggi yaitu sekitar 50–90% (Perhimpunan Dokter Spesialis Penyakit Dalam Indonesia, 2001). Adanya bakteri dalam sedimen urin menandakan terjadinya kontaminasi atau adanya infeksi saluran kemih. Penyebab patogen yang paling umum adalah bakteri *Escherichia coli* (Klapaczynska, 2018). Pada golongan umur tertentu khususnya anak, gejala klinis ISK bervariasi, dapat berupa ISK asimtomatik hingga gejala yang berat yang dapat menimbulkan infeksi sistemik. Oleh karena manifestasi klinis yang sangat bervariasi dan sering tidak spesifik, penyakit ini sering tidak terdeteksi hingga menyebabkan komplikasi gagal ginjal (Pardede, 2018).

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang dapat hidup di saluran pencernaan manusia dan hewan yang bersifat anaerob fakultatif namun dapat tumbuh pada aerob maupun anaerob (Bonkat et al., 2021). *Escherichia coli* adalah bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare dan termasuk dalam kelompok enterohemoragic yang dapat menimbulkan penyakit haemorrhagic colitis ditandai dengan diare berdarah.

Kemampuan *Escherichia coli* untuk menyebabkan infeksi saluran kemih yang berhubungan dengan faktor virulensi khususnya fimbriae tipe 1 dengan subunit adhesi (FimH). Gen FirmH 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*. Salah satu metode yang

dapat digunakan untuk menganalisis dan mendeteksi bakteri patogen adalah dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (Aris et al., 2013). Gen fimH merupakan faktor virulensi utama pada *Escherichia coli* yang mengkodekan Pili tipe 1, yang merupakan faktor virulensi yang paling umum (sekitar 80%) yang ditemukan pada Uropathogenic *Escherichia coli*. Gen fimH memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor glikoprotein manomannose dan trimannose pada sel epitel saluran kemih, memungkinkan terjadinya proses kolonisasi bakteri (Kohar dkk., 2021). ISK ditegakkan berdasarkan biakan urin, sedangkan biakan urin baru diperoleh setelah beberapa hari kemudian, sehingga perlu mengenal manifestasi klinis sebelum diperoleh hasil biakan urin agar dapat diberikan terapi awal secara empiris. Antibiotik sebagai terapi ISK diberikan jika ada kecurigaan terhadap ISK tanpa menunggu hasil biakan urin.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu proses yang berdasarkan pada reaksi enzimatik in-vitro untuk mengamplifikasi DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target menggunakan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam sebuah thermocycler. Diagnostik berbasis PCR telah dikembangkan secara efektif untuk berbagai macam mikroba karena sensitivitas, spesifisitas, dan kecepatan amplifikasinya yang baik. Primer gen FirmH yang digunakan dalam penelitian ini adalah Reverse: 5'-TGE-AAT AAT CGT ACC GTT GCG-3'; Forward: 5'- GTC CCA ATT CCT CTT ACC GTT-3'.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional. Alat yang digunakan yaitu: Spektrofotometer Uv-Vis, vortex, centrifuge, incubator, tabung sampel untuk kimia darah, minor set, timbangan digital, mikropipet, yellow tip, rak tabung,

Fitria Diniyah Janah Sayekti dkk Deteksi Gen firmH Pada Sampel Urin Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

pipet tetes, PCR, seperangkat alat elektroforesis, waterbath, gel doc. Bahan yang digunakan yaitu kit isolasi DNA sampel darah, PCR mastermix, primer, alkohol pro analisis, buffer TAE, gel agarose, parafilm, aluminium foil dan aquadest.

Prosedur yang dilakukan yaitu isolasi DNA, uji Kualitas DNA, optimasi suhu annealing dan deteksi Gen FirmH. Pemeriksaan gen dimulai dengan isolasi DNA bakteri dari sampel urin menggunakan kit isolasi dan purifikasi DNA (The DNA Extraction) dari Geneaid. Deteksi gen FirmH yaitu dengan cara fragmen DNA di amplifikasi dengan primer spesifik. Campuran reaksi PCR (volume akhir 25 μ L) yang terdiri dari: 2 μ L primer mix (1 μ L primer forward dan 1 μ L primer reverse) ke dalam microtube PCR 0,2 ml ditambahkan 15 μ L PCR master mix (1x buffer PCR, 150 nM dNTP, dan 0,5 U Taq DNA polymerase), kemudian ditambahkan 3 μ L Nuclease Free Water dan 5 μ L DNA template. Pengaturan temperatur reaksi PCR gen FirmH adalah sebagai berikut: denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 15 menit, annealing pada suhu 56°C selama 1menit, extension pada suhu 72°C selama 1 menit, dan final extension pada suhu 72°C selama 10 menit (Iran 2014). Produk PCR yang diperoleh dari proses PCR dengan kondisi PCR yang telah disesuaikan kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose.

Hasil deteksi gen FirmH dianalisa secara deskriptif berdasarkan pita DNA atau band yang nampak pada gel agarose dari elektroforesis dan hasil visualisasi dengan menggunakan gel doc.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan deteksi gen FirmH yang merupakan indikator keberadaan bakteri *E.coli* dalam sampel urin. Pengerjaan isolasi DNA diperlukan sterilitas agar

didapatkan isolat DNA yang murni dan minim kontaminasi. Untuk menghindari kontaminasi bakteri diluar saluran kemih pada saat pengambilan sampel, area genital perlu dibersihkan terlebih dahulu dengan tisu antiseptik. Sampel urin yang digunakan yaitu urin mid-stream. Aliran urin awal membantu membersihkan bakteri dan sel-sel yang mungkin ada di uretra (saluran kencing) (Seputra dkk, 2021). Pada tahap isolasi DNA didapatkan isolat DNA sebanyak 200 μ l. Hasil isolasi DNA bakteri dari sampel urin diuji secara kualitatif dan kuantitatif.

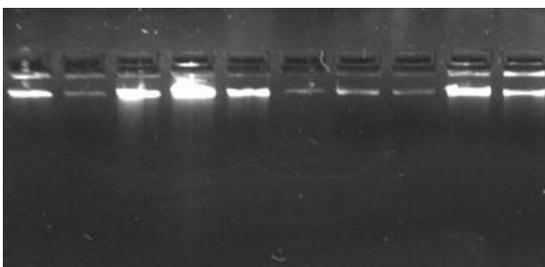
Nilai kemurnian DNA dapat ditentukan menggunakan perbandingan Optical Density (OD) larutan pada berbagai macam gelombang dengan menggunakan spektrofotometer. Tingkat kemurnian DNA dikatakan baik jika nilai rasio Optical Density (OD) 260/280 nm yang diperoleh antara 1.8-2.0. Berdasarkan hasil uji kuantitatif DNA penelitian dapat diketahui bahwa isolat DNA yang didapatkan berada dibawah rasio nilai ideal yang dapat dilihat pada Tabel 1. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya kemungkinan DNA terkontaminasi protein. Menurut Fatchiyah et al (2011) tingkat kemurnian diatas 2,0 menunjukkan bahwa DNA tidak murni disebabkan juga oleh adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna. Banyak sedikitnya DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor pada saat ekstraksi DNA dan kondisi sampel.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif isolat DNA bakteri pada urin Mahasiswa STIKES Nasional.

Sample	Konsentrasi DNA (50 ng/ μ L)	Kemurnian DNA(abs260/abs280)
N1	405.0	0.95
N2	347.7	0.71
N3	355.5	0.85
N4	336.0	0.80

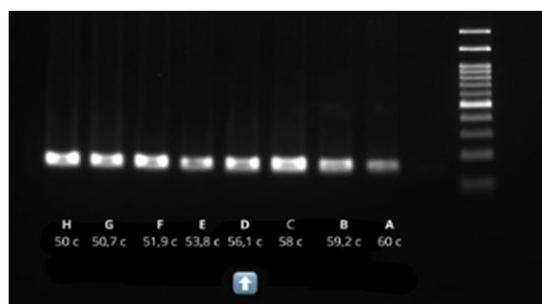
N5	328.5	0.78
N6	336.0	0.78
N7	307.5	0.73
N8	298.5	0.70
N9	293.7	0.69
N10	298.5	0.70

Isolat DNA yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan elektroforesis. Uji kualitatif dilakukan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 1,5% pada chamber yang berisi TBE 1X. Secara umum, sampel isolat DNA yang digunakan dalam uji kualitatif dapat menghasilkan pita DNA. Namun, pita DNA hasil elektroforesis yang diperoleh menunjukkan variasi pita DNA yang tebal dan tipis. Pita DNA yang tipis menunjukkan konsentrasi DNA yang paling sedikit jika dibandingkan dengan sampel lainnya. Menurut Komalasari (2009) dapat diketahui bahwa konsentrasi hasil ekstraksi pada waktu ekstraksi dan komposisi penambahan lisis buffer. Faktor kecepatan ekstraksi merupakan faktor paling berpengaruh karena pada tahap lisis sel dan presipitasi pengambilan supernatant harus dilakukan persampel, sehingga beberapa sampel terjadi pengendapan DNA. Pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) seharusnya menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh (Aulia et al, 2021). Pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (Puspitaningrum, & Solihin, 2018).



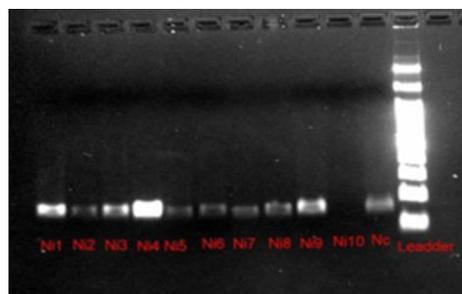
Gambar 1. Hasil Visualisasi Uji Kualitas DNA menggunakan Elektroforesis Gel Agarose

Isolat DNA dilakukan uji optimasi menggunakan PCR Gradien untuk mendapatkan suhu annealing optimal. Hasil optimasi suhu annealing dapat dilihat pada gambar 2. Suhu annealing yang optimal yaitu 56,1°C pada primer yang digunakan.



Gambar 2. Hasil optimasi suhu annealing dengan metode PCR Gradien

Setelah didapatkan suhu annealing optimal, dilakukan amplifikasi dengan menggunakan PCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA spesifik. Siklus yang bekerja antara lain denaturasi (pemutusan rantai DNA ganda), penempelan (annealing) primer spesifik, dan pemanjangan (extension) oleh enzim DNA polimerase untuk memperbanyak target DNA. Hasil amplifikasi PCR dapat diamati dengan elektroforesis gel agarosa yang tervisualisasi menggunakan GelDoc. Hasil dapat dilihat pada gambar 3. Gambar. Hasil Visualisasi deteksi gen FirmH (Target gen 164 bp).



Fitria Diniyah Janah Sayekti dkk Deteksi Gen *fimH* Pada Sampel Urin Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Gen *fimH* *Escherichia coli* pada penelitian ini ditemukan pada 9 sampel urin dari responden yang tidak memiliki gejala penyakit yang berhubungan dengan ISK dan negatif pada satu sampel. Dalam keadaan normal saluran kemih tidak mengandung bakteri, virus, atau mikroorganisme lainnya. Namun *E. coli* bisa menjadi bagian dari flora normal dalam situasi tertentu. *E. coli* yang ditemukan dalam sampel responden tanpa keluhan mungkin berasal dari translokasi bakteri dari usus ke darah atau cairan tubuh lainnya, yang dapat terjadi pada individu dengan sistem imun yang terganggu atau setelah prosedur medis tertentu.

Escherichia coli merupakan bakteri yang paling banyak ditemukan pada kasus infeksi saluran kemih yaitu 80-90%. Faktor virulensi yang berperan penting dari *E. coli* penyebab ISK adalah fimbriae tipe 1 yang merupakan faktor virulensi terbanyak pada kejadian infeksi saluran kemih (Schreiber et al., 2017). Fimbriae tipe 1 adalah struktur permukaan seperti rambut yang memungkinkan bakteri untuk menempel pada sel inang dan permukaan lain. Fimbriae tipe 1 terdiri dari protein-protein yang disusun dalam bentuk heliks, dengan adhesin (protein pengikat) di ujungnya. Adhesi yang dimediasi oleh fimbriae tipe 1 adalah langkah awal yang penting dalam kolonisasi dan infeksi. Pada infeksi saluran kemih (ISK), fimbriae tipe 1 memungkinkan *E. coli* untuk menempel pada sel-sel epitel uroepitelial, membantu bakteri bertahan terhadap aliran urine dan memulai proses infeksi. Fimbriae tipe 1 berperan dalam pembentukan biofilm, yaitu komunitas mikroba yang melekat pada permukaan dan terbungkus dalam matriks ekstraseluler. Biofilm memberikan perlindungan tambahan bagi bakteri dari lingkungan eksternal dan agen antimikroba. Protein utama yang

membentuk fimbriae tipe 1 adalah fimbriilin, yang dikode oleh gen *fimA*. Protein adhesin yang terdapat di ujung fimbriae dan bertanggung jawab atas adhesi disebut *FimH*, yang dikode oleh *genfimH* (Zharaswati et al,2019).

Keberadaan gen *fimH* tidak boleh langsung diartikan sebagai indikasi infeksi saluran kemih tanpa mempertimbangkan lokasi sampel dan gejala klinis. Tidak semua strain *E. coli* yang memiliki gen *fimH* bersifat patogenik atau menyebabkan penyakit. Beberapa strain mungkin tidak memiliki kemampuan untuk menyebabkan ISK meskipun mereka memiliki gen *fimH*. Dengan menggunakan primer yang spesifik untuk *E. coli*, PCR dapat memastikan bahwa hanya DNA *E. coli* yang diamplifikasi, sehingga mengurangi kemungkinan hasil positif palsu. Dalam kondisi normal, urin seharusnya steril dan tidak mengandung mikroorganisme. Deteksi DNA *E. coli* dalam urin normal menunjukkan adanya kontaminasi atau keberadaan flora normal. Gen *fimH* terdapat pada bakteri *Escherichia coli* baik patogen maupun non patogen. Namun adanya gen *fimH* dan lingkungan yang memadai akan membuat *Escherichia coli* tumbuh lebih cepat dan mencapai batas quorum sensing yang menyebabkan teraktivasinya faktor virulen (Kohar & Krisandi, 2021). *Escherichia coli* dapat diidentifikasi dengan cepat menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR memiliki keunggulan sensitivitas, kecepatan, dan spesifisitas yang tinggi karena menggunakan target gen spesifik pada bakteri tersebut. Metode PCR yang digunakan dalam penelitian ini sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi keberadaan gen *fimH* *E. coli*. Keunggulan PCR terletak pada kemampuannya untuk mendeteksi sejumlah kecil bakteri DNA, yang mungkin tidak terdeteksi oleh

metode kultur konvensional.

SIMPULAN

Dari pemeriksaan yang telah dilakukan mengenai isolasi, uji kualitatif, uji kuantitatif dan amplifikasi PCR dapat disimpulkan bahwa terdapat gen *fimH E.Coli* terdeteksi pada 9 sampel urin dengan panjang target 164 bp, dan negatif pada 1 sampel.

SARAN

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan memperbanyak jumlah sampel agar diperoleh informasi yang lebih mendalam terkait keberadaan gen *firmH E.coli* pada sampel urin responden normal maupun responden dengan gejala ISK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada LPPM Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang telah mendanai penelitian ini dan semua pihak terkait yang membantu kelancaran penelitian.

DAFTAR PUSTAKA (Times New Roman 12, KAPITAL, tebal)

Daftar pustaka dan pengutipan menggunakan gaya APA sixth edition atau *American Psychological Association*).

Aris, M., Harris, E., Fatuhcri Sukadi, M., & Yuhana, M. (2013). Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR (Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design) (Vol. 1, Issue 3).

Aulia, S. L., R. A. Suwignyo., dan M. Hasmeda. 2021. Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Dna Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. Jurnal

Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, 18(1), 44–54.

Bonkat G, Bartoletti R, Bruyère F, Cai T, Geerlings SE, Köves B, et al. Arnhem, Netherlands: EAU guidelines on urological infections. European Association of Urology; 2021.

Fatchiyah, dkk. 2011. Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis. Erlangga. Jakarta.

Ismaun, I., & Hikmah, N. (2021). Deteksi Molekuler Bakteri Escherichia Coli Sebagai Penyebab Penyakit Diare Dengan Menggunakan Tehnik Pcr.Bioma: Jurnal Biologi Makassar,6(2), 19.<https://doi.org/10.20956/bioma.v6i2.13194>

Klapaczynska, S. (2018). Factors associated with urinary tract infectionamong hiv-1 infected. Plos One.

Kohar, K., Krisandi, G., & Prayogo, S. A. (2021). Analisis Potensi Nanopartikel Seng Oksida Sebagai Terapi Alternatif Terhadap *Uropathogenic Escherichia coli* Penyebab Infeksi Saluran Kemih.JIMKI: Jurnal Ilmiah MahasiswaKedokteranIndonesia, 9 (1), 3847.10.53366/jimki v9i1.278

Komalasari, K. 2009. Pengaruh perbandingan volume darah dan lisis buffer serta kecepatan sentrifugasi terhadap kualitas produk DNA pada sapi Frensian Holstein (FH). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor

Pardede SO. Infeksi pada Ginjal dan

Fitria Diniyah Janah Sayekti dkk Deteksi Gen firmH Pada Sampel Urin Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Saluran Kemih Anak: Manifestasi Klinis dan Tata Laksana. Sari Pediatr. 2018;19(6):364–74.

Perhimpunan Dokter Spesialis Penyakit Dalam. (2001). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid ke-3. Balai Penerbit FKUI.

Prisela Zharaswati. 2019. Kondisi Optimal PCR Untuk Mendeteksi gen FimH Isolat Klinis *Escherichia coli* Penyebab Infeksi Saluran Kemih. Intisari Sains Medis

Puspitanungrum, R., Adhiyanti, C., & Solihin. (2018). Genetika Molekuler dan Aplikasinya. 75.

Schreiber HL, et al. 2017. *Bacterial virulence phenotypes of Escherichia coli and host susceptibility determine risk for urinary tract infections*. Sci Transl Med. 22;9(382): eaaf1283. doi: 10.1126/scitranslmed. aaf1283. PMID:28330863;PMCID:PMC5653229.

Seputra KP, Tarmono, Noegroho BS, Mochtar CA, Wahyudi I, Renaldo J, et al. Guideline Penatalaksanaan Infeksi Saluran Kemih dan Genitalia Pria. Guideline Penatalaksanaan Infeksi Saluran Kemih dan Genitalia Pria. 2015. 1–99 p.