

# KARAKTERISASI FENOTIPE ISOLAT *Staphylococcus aureus* DARI SAMPEL SUSU SAPI PERAH MASTITIS SUBKLINIS

## PHENOTYPING OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM MILK SAMPLES OF SUBCLINICAL MASTITIS COWS

Siti Isrina Oktavia Salasia<sup>1</sup>, Michael Haryadi Wibowo<sup>2</sup> dan Khusnan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta,

<sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta,

<sup>3</sup>Akademi Peternakan Brahma Putra, Yogyakarta,

### ABSTRAK

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab utama mastitis pada sapi perah yang menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar akibat turunnya produksi susu. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan karakterisasi *S. aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah di Kaliurang, Bantul, Boyolali dan Baturaden Jawa Tengah. Karakterisasi *S. aureus* meliputi uji *clumping factor*, uji koagulase, produksi hemolisin, produksi pigmen dan uji kepekaan *S. aureus* terhadap beberapa antibiotika. Dalam penelitian ini berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebanyak 32 isolat *S. aureus*. Semua isolat positif pada uji *clumping factor* dan koagulase. Alfa-hemolisis dapat diamati pada 1 isolat, 7 isolat mempunyai sifat  $\alpha$  dan  $\beta$ -hemolitik, 11 isolat  $\beta$ -hemolitik dan 13 isolat bersifat non-hemolitik. Berdasarkan produksi pigmen, 8 isolat menghasilkan pigmen berwarna oranye, 10 isolat pigmen kuning dan 8 isolat menghasilkan pigmen putih. Hasil uji resistensi antibiotik terlihat bahwa 24 isolat (75%) sensitif dan 8 isolat (25%) resisten terhadap ampisilin. Uji terhadap eritromisin diketahui 4 isolat (12,5%) sensitif, 5 isolat (15,57%) intermediet dan 23 isolat (71,97%) bersifat resisten. Sebanyak 25 isolat (78,13%) diketahui bersifat intermediet dan 7 (21,87%) resisten terhadap gentamisin. Sebanyak 4 isolat *S. aureus* (12,5%) bersifat sensitif dan 28 isolat (87,5%) resisten terhadap oksasilin. Terhadap tetrasiklin memperlihatkan sifat intermediet pada 19 isolat (59,38%), 12 isolat (37,46%) bersifat resisten dan hanya 1 isolat (3,16%) bersifat sensitif.

**Kata kunci:** *Staphylococcus aureus*, susu sapi perah, fenotipe

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is recognized as a major pathogen causing mastitis in dairy cows. The disease causes significant economic loss due to decreasing of milk production. The research was designed to isolate and characterize *S. aureus* from milk samples of dairy cows in Kaliurang, Bantul, Boyolali and Baturaden, Central Java. The characterization of *S. aureus* based on clumping factor and coagulation assay, production of hemolysins and pigments, and antibiotic sensitivity tests. Thirty two isolates were identified as *S. aureus*. All 32 isolates were positive for clumping factors and coagulases. An  $\alpha$ -hemolysis could be observed in 1 isolate,  $\alpha$ ,  $\beta$ -hemolysis for 7 isolates,  $\beta$ -hemolysis for 11 isolates, and non-hemolysis in 9 isolates. Among 32 isolates revealed that 8 isolates produced an orange pigment, 10 isolates were yellow pigmented and white pigmented for 14 isolates. The antibiotic resistance tests showed that 24 isolates (75%) were susceptible, and 8 isolates (25%) were resistant to ampicillin. Four isolates (12.5%) were susceptible, 5 isolates (15.57%) intermediate, and 23 isolates (71.97%) were resistant to erythromycin. Twenty four isolates (78.13%) were intermediate and 7 isolates (21.87%) were resistant to gentamicin. Four *S. aureus* isolates (12.5%) were susceptible and 28 isolates (87.5%) resistant to oxacillin. To tetracycline showed that 19 isolates (59.38%), were intermediate, 12 isolates (37.46%) resistant and only 1 isolate (3.16%) were susceptible.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, milk dairy cow, phenotype

## PENDAHULUAN

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab utama mastitis pada sapi dan kejadian mastitis sering diasosiasikan dengan infeksi *Staphylococcus aureus* (Swart *et al.*, 1984; Shah *et al.*, 1985). Watts *et al.* (1986) melaporkan bahwa *S. aureus* merupakan patogen utama yang sering menyebabkan mastitis subklinis dan kronis. Agus (1991) melaporkan bahwa diantara 56 ekor sapi perah di peternakan sapi perah Baturaden, 41 ekor (73,2%) menderita mastitis subklinis, dan 9,1% diantaranya disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*. Selanjutnya Barkema *et al.* (1998) juga melaporkan bahwa mastitis klinis di peternakan sapi perah di Belanda disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* dan *Pseudomonas sp.* Smith *et al.* (1998) melaporkan bahwa wabah mastitis di USA pernah disebabkan oleh agen tunggal *Staphylococcus aureus* dengan strain yang sama.

Patogenisitas dan virulensi *Staphylococcus sp.* ditentukan oleh substansi-substansi yang diproduksi oleh organisme ini antara lain adalah enzim ekstraseluler yang dikenal dengan eksoprotein. *Staphylococcus aureus* memproduksi eksoprotein yang dibagi menjadi 2 kelompok utama yaitu, kelompok enzim antara lain koagulase, lipase, hialuronidase, stafilokinase (fibrinolisin) dan nuklease serta kelompok eksotoksin misalnya leukosidin, eksfoliatif toksin, enterotoksin dan *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1). Hemolisin merupakan eksoprotein yang mempunyai aktivitas baik enzimatis maupun toksin sehingga tidak termasuk dalam klasifikasi ini (Williams *et al.*, 2000). Sitolitik toksin yang dihasilkan oleh *S. aureus* adalah  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , dan  $\gamma$ -hemolisin (Joklik *et al.*, 1992; Brückler *et al.*, 1994). Eksoprotein enzimatis ini kemungkinan mempunyai fungsi utama dalam menyokong nutrisi untuk pertumbuhan bakteri, sedangkan eksotoksin berperan dalam menimbulkan berbagai penyakit (Williams *et al.*, 2000).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen utama pada manusia yang menyebabkan berbagai penyakit secara luas yang berhubungan dengan *toxic shock syndrome* sebagai akibat dari keracunan pangan. Disamping itu *S. aureus* bertanggung jawab atas 80% penyakit supuratif, dengan permukaan kulit sebagai habitat alaminya. Manifestasi klinis *Staphylococcus aureus* pada manusia antara lain adalah impetigo, *scalded skin syndrome*, pneumonia, osteomielitis, pioartrosis, endokarditis, *metastasis staphylococcal*, keracunan makanan, *toxic shock syndrome* (TSS), meningitis dan sepsis (Joklik *et al.*, 1992; Emmerson, 1994; Ena *et al.*, 1994).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui beberapa karakter fenotipik *Staphylococcus aureus* yang terdapat dalam susu sapi perah yang secara klinis tidak menunjukkan gejala sakit di wilayah peternakan sapi perah di Kaliurang, Bantul, Baturaden dan Boyolali.

## MATERI DAN METODE

Bakteri diisolasi dari susu sapi perah di wilayah Kaliurang, Bantul Yogyakarta, Baturaden dan Boyolali. Identifikasi awal meliputi seleksi pada medium *mannitol salt agar* (MSA), pewarnaan Gram dan uji biokimiawi. Selanjutnya dilakukan uji koagulase dengan menggunakan tabung Bactident-coagulase (Merck, Darmstadt, Germany) dan uji *clumping factor* dengan menggunakan plasma kelinci. Pada uji koagulase, bakteri ditanam dalam tabung bactident-coagulase, diinkubasikan selama 18 jam pada suhu 37°C, kuman *S. aureus* akan menunjukkan reaksi positif pada uji koagulase dengan menunjukkan adanya gumpalan pada tabung. Pada uji *clumping factor*, *S. aureus* menunjukkan reaksi positif yaitu terjadinya aglutinasi dengan serum kelinci pada obyek gelas (Brückler *et al.*, 1994). Produksi hemolisin ditentukan adanya interferensi antara *S. aureus* yang mengandung beta toxin (Referen strain) dengan isolat yang diuji pada plat agar (agar base, Oxoid, Jerman) darah

domba, setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Skalka *et al.*, 1979). Produksi pigmen bakteri dapat dilihat dengan cara mengulaskan bakteri diatas membran nitroselulose yang diletakkan diatas plat agar darah domba, warna pigmen akan terlihat setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Brückler *et al.*, 1994).

Kepekaan *S. aureus* terhadap beberapa antibiotika ditentukan dengan menempatkan lempengan diskus antibiotik (Oxoid) pada agar Müller-Hinton (Oxoid). Antibiotik yang digunakan adalah ampisilin (10 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), oksasilin (5 µg), dan tetrasiklin (30 µg). Zona inhibisi yang terbentuk disekitar lempengan antibiotic pada

agar Müller-Hinton dievaluasi sesuai dengan ketentuan National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Anonim, 1998).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian diperoleh 32 sampel susu sapi perah yang secara klinis sehat ternyata mengandung *S. aureus* penyebab utama mastitis pada sapi perah. Mastitis subklinis menjadi masalah yang sangat serius bagi para peternak, karena sapi tidak menunjukkan gejala sakit tetapi produksi susu dapat turun dan kualitas susu menjadi berkurang karena adanya kuman tersebut.

Tabel 1. Karakter fenotipe *Staphylococcus aureus* isolat sapi perah di wilayah Jawa Tengah

No	Kode	Asal Isolat	Uji MSA	Koagulase	Clamping Factor	Sifat Hemolisa	Produksi Pigmen
1.	Y1	Kaliurang	+	+	+	non-hem	kuning
2.	Y3	Kaliurang	+	+	+	non-hem	orange
3.	Y5	Kaliurang	+	+	+	α	orange
4.	Y7	Kaliurang	+	+	+	α, β	orange
5.	Y10	Kaliurang	+	+	+	α, β	orange
6.	K1	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
7.	K5	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
8.	K10	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
9.	K11	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
10.	K13	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
11.	K14	Kaliurang	+	+	+	non-hem	putih
12.	BY5	Boyolali	+	+	+	α, β	kuning
13.	BY7	Boyolali	+	+	+	α, β	kuning
14.	BR2	Baturaden	+	+	+	α, β	putih
15.	BR3	Baturaden	+	+	+	α, β	putih
16.	BR10	Baturaden	+	+	+	α, β	putih
17.	S2-3	Bantul	+	+	+	β	kuning
18.	S3-1	Bantul	+	+	+	β	kuning
19.	S3-4	Bantul	+	+	+	β	kuning
20.	S4-1	Bantul	+	+	+	β	kuning
21.	S4-3	Bantul	+	+	+	non-hem	putih
22.	S6-2	Bantul	+	+	+	β	orange
23.	S7-4	Bantul	+	+	+	non-hem	putih
24.	S10-3	Bantul	+	+	+	β	kuning
25.	S11-3	Bantul	+	+	+	β	orange
26.	S13-1	Bantul	+	+	+	non-hem	putih
27.	S13-4	Bantul	+	+	+	non-hem	putih
28.	S14-1	Bantul	+	+	+	β	orange
29.	S14-2	Bantul	+	+	+	β	kuning
30.	S15-1	Bantul	+	+	+	non-hem	putih
31.	S16-3	Bantul	+	+	+	β	orange
32.	S17-2	Bantul	+	+	+	β	kuning

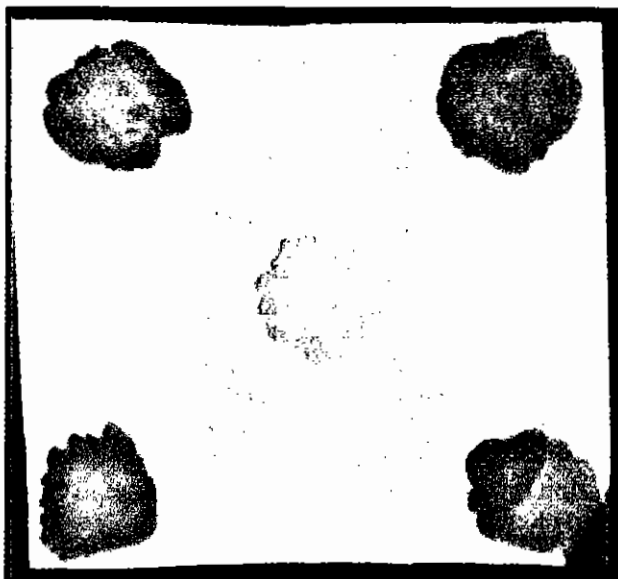
Keberadaan *S. aureus* dalam susu juga membahayakan bagi masyarakat karena diketahui bahwa kuman ini mengandung berbagai macam enterotoksin yang menyebabkan *toxic shock syndrome* (Marrack dan Kappler, 1990; Dingess et al., 2000; Omoe et al., 2002).

Hasil identifikasi dan karakterisasi *S. aureus* asal dari berbagai sampel susu di wilayah Jawa Tengah dapat dilihat pada Tabel 1. Profil fenotipik *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Dari hasil pengamatan fenotipik diketahui bahwa semua isolat positif pada uji MSA, positif koagulase dan *clumping factor* yang mengindikasikan bahwa kuman yang diisolasi tersebut murni *S. aureus* (Brückler et al., 1994;

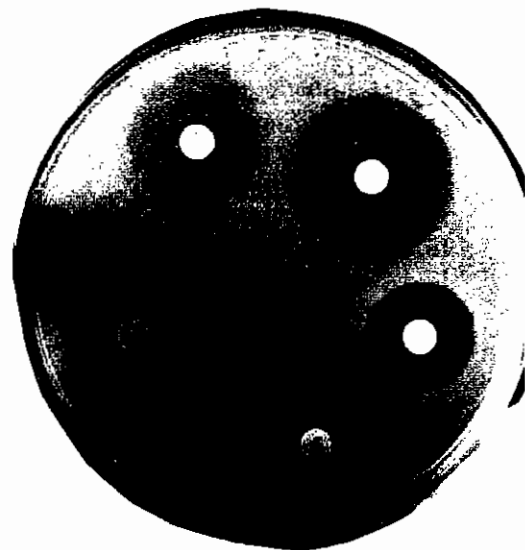
Salasia et al., 2004). Reaksi koagulase positif, sangat penting untuk membedakan *S. aureus* dengan spesies staphylococcus yang lain (Brückler et al., 1994). Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. aureus* yang dapat menggumpalkan plasma dengan bantuan factor yang terdapat dalam serum. Faktor koagulase (*coagulase reacting factor*, CRF) serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan cara sama seperti pengaktifan protrombin menjadi trombin (Jawetz et al., 1982; Joklik et al., 1992). Oleh karena itu peran koagulase yang dihasilkan oleh *S. aureus* ini dapat digunakan sebagai sarana diagnostik



Gambar 1. Koloni *S. aureus* memfermentasi mannitol pada plat *mannitol salt agar* (MSA, kiri), profil *S. aureus* pada plat agar darah domba, non-hemolitik (tengah), -hemolitik (kanan).



Gambar 2. *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi berbagai pigmen oranye, kuning maupun putih.



Gambar 3. Zona inhibisi yang dibentuk oleh *S. aureus* terhadap berbagai antibiotika pada plat agar Müller-Hinton

(Brückler *et al.*, 1994). Reaksi *clumping factor* terjadi berdasarkan reaksi antara *S. aureus* dengan fibrinogen yang terdapat dalam serum yang ditunjukkan dengan adanya gumpalan koagulase pada glas obyek. Sifat ini digunakan sebagai kriteria penentuan *S. aureus* (Brückler *et al.*, 1994).

Kuman *S. aureus* isolat sapi perah menunjukkan karakter yang bervariasi dalam memproduksi hemolisin dan pigmen, kebanyakan *S. aureus* yang bersifat menghemolisis darah memproduksi pigmen kuning maupun oranye. Warna pigmen menentukan sifat patogenisitas dari *S. aureus*. Kuman *S. aureus* yang memproduksi pigmen kuning ataupun oranye biasanya lebih patogen dibanding kuman yang memproduksi pigmen putih (Brückler *et al.*, 1994). Hemolisin merupakan salah satu toksin penting yang dibentuk oleh *S. aureus*. Menurut Jawetz *et al.* (1982),  $\alpha$ -hemolisin dapat melarutkan eritrosit kelinci dan merusak trombosit. Toksin ini juga merusak sistem sirkulasi, jaringan otot dan jaringan korteks ginjal dan dapat menimbulkan kerusakan berbagai jaringan. Beta-toksin dilaporkan dapat menyebabkan *hot-cold*, reaksi toksin ini dalam kondisi dingin (pada suhu 4°C) akan meningkat (Brückler *et al.*, 1994), dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan meningkatkan hemolisis (Joklik *et al.*, 1992).

Hasil uji ketahanan *Staphylococcus aureus* terhadap berbagai antibiotika dapat dilihat pada Tabel 2.

Zona inhibisi yang dibentuk oleh *S. aureus* terhadap berbagai antibiotika yang

menggambarkan sifat resistensi terhadap beberapa antibiotika dapat dilihat pada gambar 3.

Berdasarkan uji sensitifitas terhadap berbagai antibiotika diketahui bahwa sebagian besar *S. aureus* telah resisten terhadap oksasilin (87,5%) dan eritromisin (71,97%), dan ada beberapa isolat yang juga telah resisten terhadap tetrasiklin (37,46%), ampicilin (25%), dan gentamisin (21,87%). Sebagian isolat juga bersifat intermediet terhadap gentamisin (78,13%), tetrasiklin (59,38%) dan eritromisin (15,57%). Sifat intermediet terhadap beberapa antibiotika ini mengindikasikan bisa berubah menjadi resisten. Melihat sifat resistensi terhadap berbagai antibiotika ini menunjukkan bahwa pengobatan mastitis dengan berbagai macam antibiotika tidak efektif lagi, sehingga perlu dilakukan alternatif penanganan untuk mengatasi problem mastitis pada peternakan di wilayah Jawa Tengah.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai melalui proyek RUT XI. Ucapan terimakasih disampaikan kepada drh. Soegiyono, Woro Sri Purwaningsih, SKH dan Joko Purwoko yang telah membantu dalam koleksi spesimen dan identifikasi isolat.

#### DAFTAR PUSTAKA

Agus, M., 1991. Mastitis study in dairy cattle in Baturraden. *Hemerazoa*. 74, 21-24.

Tabel 2. Persentase resistensi 32 isolat *S. aureus* isolat sapi perah terhadap berbagai antibiotika

No.	Jenis Antibiotika	Sensitif	Intermediet	Resisten
1.	Ampicilin	24 (75%)	0 (0%)	8 (25%)
2.	Eritromisin	4 (12,5%)	5 (15,57%)	23 (71,97%)
3.	Gentamisin	0 (0%)	25 (78,13%)	7 (21,87%)
4.	Oksasilin	4 (12,5%)	0 (0%)	28 (87,5%)
5.	Tetrasiklin	1 (3,16%)	19 (59,38%)	12 (37,46%)

- Anonim, 1998. National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard ASM-2, Vol. 14, No. 16. Villanova, PA.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Beiboer, L. M., Wilmink, H., Bonedictus, G., and Brand, A., 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categorie by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy. Sci.* 81, 411-419.
- Brückler, J., Schwarz, S., Untermann, F., 1994. Staphylokokken-Infektionen und – Enterotoxine, Band. II/1, In Blobel, H. und Schließer (eds.), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M., 2000. Enterotoxin of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16-34.
- Emmerson, M., 1994. Nosocomial staphylococcal outbreaks. *Scan. J. Infect. Dis.* 93 (Suppl.), 47-54.
- Ena, J., Boelaert, J. R., Boyken, L., van Landuit, H. W., Godart, H. W., and Herwaldt, L. A., 1994. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. *Infect. Immun.* 66, 573-580.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A., 1982. Microbiology for medicine. 14<sup>th</sup> ed. Lange Medical Publications. Los Altos. California. p. 258.
- Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert, C. M., 1992. Zinsser microbiology. 20<sup>th</sup> ed. Appleton and Lange. California. Pp. 401-413.
- Marrack, P. and Kappler J. 1990. The staphylococcal enterotoxin and their relatives. *Science.* 248, 705-711.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. – L., Ueda, Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring *seg*, *seh*, and *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857-862.
- Salasia, S.I.O., Z. Khusnan, Lämmler C. and Zschöck M. 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.* 5 (2), 103-109.
- Shah, N. M., Kher H.N., Dholakia P.M. and Simaria M.B. 1985. Studies on staphylococci in udder of catle. *Indian Vet. J.* 62, 458-460.
- Skalka, B., Smola, J., and Pillich, J., 1979. A simple method of detecting staphylococcal hemolysin. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 245, 283-286.
- Smith, T.H., Lawrence K.F., and Middleton, J.R. 1998. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *JAVMA.* 212, 553-556.
- Swart, R., Jooste, P.J. and Novello, J.C., 1984. Prevalence and types of bacteria associated subclinical mastitis in Bloem Fonte in dairy herds. *Vet. Assoc.* 51, 61.
- Watts, J.L., Owens, W.E. and Nickerson, S.C. 1986. Identification of staphylococci from bovine udders: evaluation of the API 20GP system. *Can. J. Microbiol.* 32, 359-361.
- Williams, R.J., Ward, J.M., Henderson, B., Poole S., O'Hara B.P., Wilson M., Nair