

## Isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dari susu mastitis subklinis di Tasikmalaya, Jawa Barat

### Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from subclinical infection dairy cattle in Tasikmalaya, West Java

NINA HERLINA, FIFI AFIATI, ADITIA DWI CAHYO, POPPY DWIE HERDIYANI, QUROTUNNADA, BAHARUDDIN TAPPA

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Bogor KM. 46 Cibinong 16911, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.  
Tel./Fax. +62-021-8754587, \*email: drh.nina\_herlina@yahoo.com

Manuskrip diterima: 5 Desember 2014. Revisi disetujui: 5 Mei 2015.

**Abstrak.** Herlina N, Afiati F, Cahyo AD, Herdiyani PD, Qurotunnada, Tappa B. 2015. Isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dari susu mastitis subklinis di Tasikmalaya, Jawa Barat. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 413-417*. Mastitis subklinis merupakan penyakit radang ambing yang paling banyak menimbulkan dampak ekonomi cukup besar di kalangan peternak sapi perah. Hal tersebut dikarenakan menurunnya kuantitas dan kualitas susu. Penyebab paling umum dari peradangan ambing tersebut di antaranya mikroorganisme, seperti *E. coli*, *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai salah satu bakteri patogen yang sering dijumpai pada kejadian mastitis. Pengambilan sampel susu dilakukan secara acak (*random sampling*) dengan terlebih dahulu melakukan *California Mastitis Test* (CMT). Sampel susu yang positif mastitis subklinis kemudian diisolasi menggunakan media *Manitol Salt Phenol Red Agar* (MSPRA). Selanjutnya dari isolat bakteri dengan koloni berwarna kuning yang mampu memfermentasi *phenol red* menjadi warna kuning, dilakukan pewarnaan Gram. Tampilan mikroskopik terlihat sel berbentuk bulat dan bergerombol tersebut selanjutnya dilakukan kultur bakteri menggunakan *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam. Hasil kultur kemudian diekstraksi untuk mendapatkan DNA bakteri dan dilakukan analisis PCR. Hasil menunjukkan bahwa enam isolat dari sepuluh sampel susu sapi mastitis merupakan *Staphylococcus aureus*.

**Kata kunci:** CMT, Mastitis subklinis, PCR, *Staphylococcus aureus*

**Abbreviation:** CMT = *California Mastitis Test*, PCR = *Polymerase Chain Reaction*

**Abstract.** Herlina N, Afiati F, Cahyo AD, Herdiyani PD, Qurotunnada, Tappa B. 2015. *Isolation and identification of Staphylococcus aureus from subclinical infection dairy cattle in Tasikmalaya, West Java. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 413-417*. Subclinical mastitis is an inflammatory disease of the udder as the most considerable economic impact among dairy farmers, due to a decrease in the quantity and quality of milk. The most common cause of the udder inflammation includes microorganisms, such as *E. coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to isolate and identify the bacteria *Staphylococcus aureus* as one of the pathogenic bacteria that were often found in the incidence of mastitis. Milk sampling was randomly conducted by doing the *California Mastitis Test* (CMT). A positive sample of the subclinical mastitis milk then isolated using the *Mannitol Salt Phenol Red Agar* (MSPRA) media. Furthermore, from bacterial isolates with yellow colonies able to ferment phenol red into yellow, the Gram staining was conducted. Microscopic appearance looks round and clustered cells were then carried out using a bacterial culture *Nutrient Broth* (NB) for 24 hours. Results culture was then extracted to obtain bacterial DNA and PCR analysis. The results showed that the isolates from ten samples of cattle's were *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** CMT, subclinical mastitis, PCR, *Staphylococcus aureus*

## PENDAHULUAN

Susu merupakan sumber protein hewani yang kaya akan nutrisi. Susu bahkan dianggap sebagai pelengkap gizi untuk proses tumbuh kembang. Susu sapi merupakan yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat karena relatif terjangkau. Selain tersedia dalam bentuk olahan, susu juga dapat dikonsumsi segar. Susu segar merupakan cairan yang berasal dari ambing sapi sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau tidak ditambah sesuatu

apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali pendinginan (Standar Nasional Indonesia 2011). Salah satu potensi bahaya yang terdapat pada susu dan berbagai produk olahannya adalah bahaya mikrobiologis (*microbial hazard*), khususnya keberadaan bakteri patogen (Winarso 2008). Penelitian yang dilakukan Sugiri dan Anri (2014) menunjukkan 83,56% sampel yang diperiksa di wilayah Jawa Barat (Lembang, Pangalengan, Cianjur) mengandung bakteri (*S. aureus*, *S. agalactiae* dan bakteri lainnya) penyebab mastitis.

Ada berbagai faktor penyebab terjadinya mastitis, di antaranya yaitu berbagai jenis mikroorganisme patogen yang masuk ke dalam ambing melalui saluran puting susu. Beberapa faktor predisposisi (pemicu) terjadinya infeksi kelenjar susu antara lain: pemerahan yang tidak higienis, manajemen pemerahan yang salah, luka pada puting susu, dan adanya mikroorganisme patogen di lingkungan kandang. Penularan mikroorganisme patogen mastitis dapat terjadi dari satu puting ke puting lainnya pada satu ambing atau antar sapi pada saat pemerahan secara manual. Hal ini dapat terjadi melalui tangan pemerah, air untuk mencuci ambing, kain lap yang dipakai untuk mengeringkan ambing sebelum dan sesudah pemerahan, atau peralatan lain.

Mastitis dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme. Setidaknya telah dikenal hingga kini ada 137 penyebab infeksi mastitis dan pada hewan besar jenis patogen yang paling dikenal adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, spesies *Streptococcus* lainnya dan *Coliform* (Sumathi et al. 2008). Mastitis sering juga dihubungkan dengan organisme lainnya seperti *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella* dan *Prototheca* (Rodostits et al. 2007). Namun, sebagian besar kasus mastitis disebabkan oleh beberapa spesies bakteri patogen yang sama, yaitu dari spesies *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Coliforms* dan *Actinomyces pyogenes* (Du Preeze 2000; Quinn et al. 2004).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri dominan penyebab mastitis subklinis. Menurut Shearer dan Harris (2003), mastitis subklinis sangat penting untuk ditangani karena fakta menunjukkan bahwa prevalensi mastitis

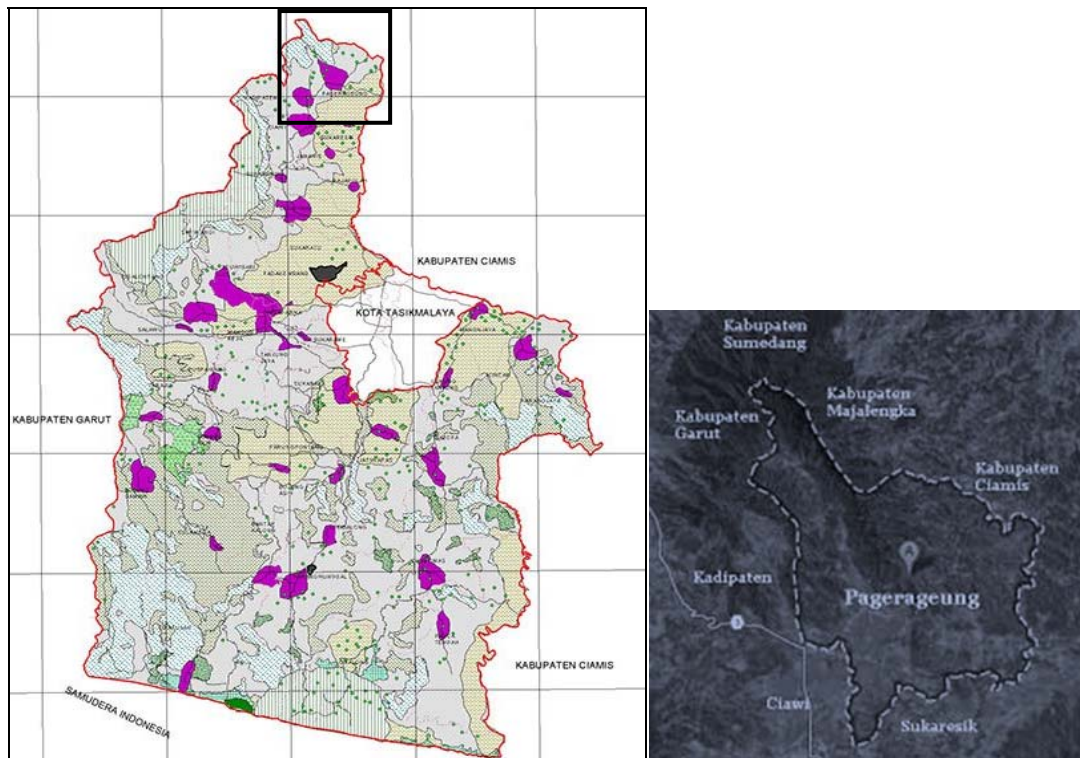
subklinis 15-40 kali lebih tinggi dibandingkan bentuk klinis. Mastitis subklinis biasanya terjadi lebih dahulu sebelum mastitis klinis dan berdurasi lebih lama, sulit untuk dideteksi dan menjadi reservoir mikroorganisme yang akan menginfeksi hewan lainnya yang ada berdekatan dengan sapi terinfeksi. *S. aureus* penyebab mastitis juga menimbulkan masalah kesehatan masyarakat yang potensial, karena lebih dari setengah strain terisolasi di susu yang berasal dari kelenjar yang terinfeksi memiliki gen enterotoksin (kurang dari 10000 CFU/mL) dan dapat menyebabkan keracunan *staphylococcal* dalam produk susu fermentasi (Le Marechal et al 2011). *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk menjadi resisten terhadap antibiotik dengan memproduksi sejumlah besar faktor virulensi termasuk sejumlah exotoxin dan protein membran sel (Fitzgerarld et al. 2000).

Penelitian ini dilakukan untuk melihat jenis bakteri penyebab mastitis yang terdapat pada sapi perah di daerah Pagerageung dan mengisolasi serta mengidentifikasi bakteri jenis *Staphylococcus aureus* sehingga dapat berguna untuk pencegahan dan pengobatan kejadian mastitis di lapangan.

## BAHAN DAN METODE

### Area kajian

Wilayah pengambilan sampel susu mastitis subklinis dilakukan di sentra sapi perah di Kecamatan Pagerageung, Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat (Gambar 1).



**Gambar 1.** Lokasi penelitian di Pagerageung, Tasikmalaya

## Cara kerja

### California Mastitis Test (CMT)

CMT dilakukan sesuai dengan metode Schalm dan Noorlander (1957). Setiap 2 ml susu dari masing-masing puting diperah pada paddle, ditambahkan 2 ml reagen CMT (Bovivet, Kruuse, Denmark) kemudian diaduk perlahan dan diamati reaksi yang terjadi setelah 10 detik. Hasil reaksi bernilai 0-4 dimana 0 berarti tidak terjadi reaksi sedangkan 4 memperlihatkan kekentalan dan status terinfeksi berat.

### Isolasi bakteri dengan media selektif Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA)

Sebanyak 1 ml sampel susu diambil dan dimasukkan dalam tabung berisi 9 ml larutan pengencer. Sebanyak 0.1 mL sampel ditaruh pada cawan petri kemudian tuangkan Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA) sebanyak 15 mL, homogenkan dan biarkan memadat (Lay 1994). Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

### Identifikasi dengan pewarnaan Gram

Sebanyak satu mata ose koloni bakteri diambil secara aseptis, keringkan dan fiksasi di atas lampu bunsen. Setelah kering, teteskan zat warna crystal violet sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir dan keringkan lalu teteskan lagi dengan larutan lugol, dan biarkan selama 1 menit, lalu cuci dengan air mengalir, dan keringkan. Cuci lagi dengan alkohol 70% selama 30 detik, cuci dan keringkan. Berikan larutan safranin selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan keringkan. Amati dengan mikroskop dan catat hasilnya.

### Identifikasi dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari koloni tunggal pada media Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA) dan pewarnaan Gram. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit (Genomic DNA Geneaid), selanjutnya dilakukan analisis PCR dan elektroforesis. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer sebagai berikut: *S. aureus* (forward: 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'; reverse: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3').

## Analisis data

Analisis data dilakukan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Mastitis merupakan salah satu penyakit yang sering ditemui pada sapi perah dan menimbulkan dampak ekonomi yang cukup besar, karena menyebabkan penurunan produksi dan kualitas susu. Selain itu waktu afkir sapi pun menjadi lebih cepat. Peradangan ambung yang dibiarkan dapat berjalan kronis sehingga ambung menjadi kecil, kering dan tidak produktif. Menurut Supar (1997), penurunan produksi susu akibat mastitis subklinis berkisar antara 14,6-19,0% per hari atau sekitar 2 L untuk setiap ekor sapi per hari.

Ada berbagai alat bantu diagnosis lapang (*rapid test*) untuk mastitis subklinis, di antaranya *Aulendorfer Mastitis Probe* (AMP), IPB-1 Test, *Breed Method* dan *California*

*Mastitis Test* (CMT). CMT merupakan jenis tes yang umum digunakan. Adapun reaksi terjadi akibat adanya ikatan antara antigen dan antibodi dengan memperlihatkan kekentalan bernilai 0-4. Tabel 1 menunjukkan, semakin tinggi nilai CMT, semakin tinggi jumlah sel somatik yang ditunjukkan dengan viskositas reaksi yang semakin tinggi (Gambar 2).

Dari 15 ekor sapi yang diperiksa menggunakan CMT, diperoleh 13 ekor sapi yang menderita mastitis subklinis derajat 1-3 dengan 53,84% jumlah sel somatik antara 800.000-5.000.000 CFU/mL. Angka tersebut sudah melebihi batas ambang SNI tahun 2000 dimana jumlah bakteri total pada susu segar  $1 \times 10^6$  dan susu pasteurisasi  $<3 \times 10^4$ . Menurut Salasia et al. (2005), di antara 56 ekor sapi perah di peternakan sapi perah Baturaden, 41 ekor (73,2%) menderita mastitis subklinis dan 9,1% di antaranya disebabkan oleh *S. aureus*.

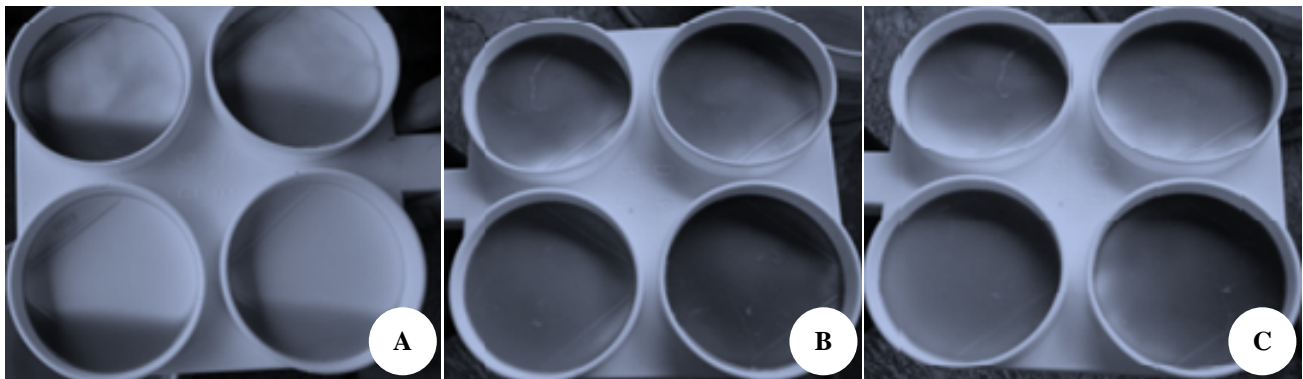
Hasil isolasi pada media Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA) menunjukkan bentuk koloni bulat besar, bulat kecil, berkelompok seperti buah anggur, dan beberapa ireguler, dengan warna putih dan kuning terdapat zona bening hemolisis (Gambar 2A). Zona hemolisis terbentuk karena adanya toksin hemolisin yang diproduksi oleh *S. aureus*. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diduga *S. aureus* secara morfologi ternyata benar termasuk Gram positif karena sel bakterinya berwarna ungu (gambar 2B). Dengan pewarnaan gram berwarna biru-ungu (+), bulat dan bergerombol seperti anggur. *Staphylococcus aureus* merupakan bagian dari flora normal susu segar dan olahannya, namun bakteri ini mampu menyebabkan terjadinya wabah keracunan makanan (Monrandi et al. 2007).

*Staphylococcus aureus* termasuk jenis bakteri yang tidak mudah untuk diisolasi karena umumnya bercampur dengan flora normal *coagulase negative staphylococcus* (CoNS) yaitu *S. epidermidis* dan *Staphylococcus haemolyticus*. Hingga saat ini belum ditemukan media selektif untuk isolasi dan identifikasi koloni ini secara langsung, namun media Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSRPA) masih dianggap memberikan hasil yang baik sehingga direkomendasikan baik oleh BSAC maupun *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) dan pada saat ini secara luas digunakan di seluruh dunia untuk mengisolasi *S. aureus* (Brown et al. 2003). *Staphylococcus aureus* akan memfermentasi warna merah mannitol menjadi kuning dan pada pewarnaan gram akan berbentuk coccus berwarna ungu. Bakteri ini merupakan bakteri pembentuk enterotoksin yang dapat menyebabkan keracunan pangan. Sugiri dan Anri (2014) menerangkan bahwa *S. aureus* memiliki karakteristik ukuran sedang, warna putih kekuningan dan memiliki koloni dengan pola hemolisis pada agar darah adalah  $\alpha$ -dan  $\beta$ -hemolysis.

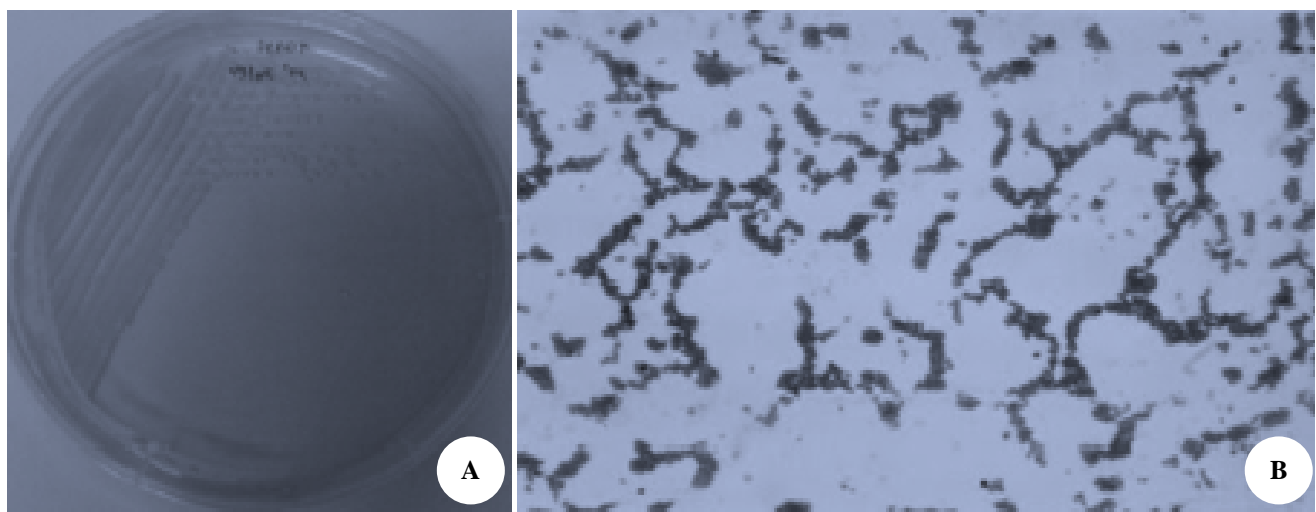
**Tabel 1.** Nilai CMT dan jumlah sel somatik

Nilai CMT	Jumlah sapi	Jumlah sel somatik (SCC)	Manifestasi mastitis
1	4	400.000-1.500.000	Mastitis subklinis
2	7	800.000-5.000.000	Mastitis subklinis
3	2	>5.000.000	Mastitis subklinis

Keterangan: Nilai SCC berdasarkan CMT



**Gambar 1.** Hasil CMT pada ternak sapi perah di Tasikmalaya. A. Hasil CMT 1, B. CMT 2, C. CMT 3.



**Gambar 2.** A. Hasil isolasi bakteri pada media *Mannitol Salt Phenol Red Agar* (MSPRA); B. Hasil pewarnaan Gram



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis agarose 1% (M: Marker DNA Ladder 100 bp, 3,5,6,22,24,25. *Staphylococcus aureus*)

Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan melihat faktor virulensi seperti protein A, *clumping factor*, koagulase atau nuklease dan uji kepekaan terhadap antimikroba. Identifikasi dapat pula dilakukan secara langsung dengan kit yang telah diproduksi secara komersial seperti *latex agglutination kit*. Selain itu, analisis molekuler menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dengan *typing* genotipe marak dilakukan.

Terlebih lagi saat ini telah tersedia ratusan *software* program filogenetik untuk membantu menganalisis berbagai pita (*band*) hasil elektroforesis, sekuen DNA dan hasil hibridisasi sehingga *typing* genetik menjadi lebih akurat dan efisien (Enright et al. 2000). Gambar 3 menunjukkan hasil elektroforesis produk PCR pada agarose gel 1% dengan voltase 100 selama 20 menit, dimana berat molekul memperlihatkan pita (*band*) antara 100-200 bp. Sebanyak 6 dari 28 isolat (21.4%) memiliki pita berukuran sekitar 116 bp. Menurut Prasetyo *et al.* (2014), yang mengisolasi *S. aureus* dengan amplifikasi gen *tst*, terdapat 2 dari 3 isolat memberikan hasil positif. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA yang memiliki panjang spesifik (350 bp) sesuai dengan produk *polymerase chain reaction* (PCR) dari referensi dan *database GeneBank*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis mengucapkan terima kasih atas dana penelitian DIPA PN Meat Pro, Laboratorium Reproduksi,

Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan serta Laboratorium Mikrobiologi Terapan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standardisasi Nasional [BSN]. 2011. Susu Segar Bagian 1: Sapi. SNI 01-3141-2011. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta.
- Du Preeze JH. 2000. Bovine mastitis therapy and why it fails. *J. South Africa Vet Assoc* 71: 201-208.
- Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38: 1008-1015.
- Le Marechal C, Thiery R, Vautour E, Le Loir Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci Technol* 91: 247-282
- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol* 124:66-72.
- Prasetyo B, Kusumaningrum EN. 2014. Deteksi gen *tst* isolat *staphylococcus aureus* melalui amplifikasi 23s rna asal susu kambing dan sapi perah. *Jurnal Kedokteran Hewan* 18 (1):76-79.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 2004. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mostby Publishing, London.
- Rodostits, M., C. Gay., W. Hinchcliff and D. Constable. 2007. *Veterinary Medicine, A Test Book of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th ed. Grafos, S.A. Arte Sobre Papel, Spain.
- Salasia OIS, Wibowo HM, Khusnan. 2005. Karakterisasi fenotipe isolat *Staphylococcus aureus* dari sampel susu sapi perah mastitis subklinis. *Jurnal Sain Veteriner* Vol 23(2).
- Schalm OW, Noorlander DO. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *JAVMA* 130 (5): 199-207.
- Shearer JL, Harris B, Jr. 2003. *Mastitis in Dairy Goats*. Anim. Sci. Dept. Florida Coop. Ext. Serv. Inst. Food Agri. Sci; Univ. Fl. Gainesville, USA.
- Sugiri YD, Anri A. 2014. Prevalensi patogen penyebab mastitis subklinis (*Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalatae*) dan patogen penyebab mastitis subklinis lainnya pada peternak skala kecil dan menengah di beberapa sentra peternakan sapi perah di Pulau Jawa. <http://disnak.jabarprov.go.id/>. [12 Desember 2014].
- Sumathi BR, Veeregowda BM, Amitha R. 2008. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. *Vet World* 1: 237-238.
- Supar. 1997. Mastitis subklinis pada sapi perah di Indonesia: masalah dan pendekatannya. *Wartazoa* Vol 6(2): 48-52.
- Winarso D. 2008. Hubungan kualitas susu dengan keragaman genetic dan prevalensi mastitis subklinis di daerah jalur susu Malang sampai Pasuruan. *J Sain Vet* 26 (2): 58-65.
- Brown D, Cookson B. 2003. Detection of *MRSA*. In: Fluit Ad C, Schitz FJ (eds). *MRSA: Current perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk England.