

Isolasi dan Identifikasi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus pseudintermedius* pada Kasus Klinis Anjing dan Kucing di Yogyakarta

Isolation and Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius from Clinical Cases of Dog and Cat in Yogyakarta

Ghias Ghifari Alhadz¹, Siti Isrina Oktavia Salasia^{1*}, Alyaa Rifqoh Putri Yosyana¹, Madarina Wasissa¹,
Fajar Budi Lestari², Rini Widayanti¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Veteriner, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author, Email: isrinasalasia@ugm.ac.id

Naskah diterima: 27 September 2024, direvisi: 4 Desember 2024, diterima: 16 Desember 2024

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), are known as bacterial resistant to various antibiotics. MRSA transmission occurs between humans and direct human contact with dogs and cats. This study aimed to isolate, characterize, and analyze bacterial resistance to antibiotics phenotypically and genotypically from clinical case samples of pet animals in Yogyakarta. Bacterial isolates were identified through biochemical tests and molecular identification by species-specific 23S rRNA and *nuc* genes with polymerase chain reaction (PCR) and *pta* genes with PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). Bacterial resistance to several antibiotics was analyzed using disk diffusion Kierby-Bauer method. The occurrence of methicillin resistance were screened by oxacillin resistance screening agar base (ORSAB) and confirmed by detection of the *mecA* gene with PCR. Based on the phenotypic and genotypic identification showed that 11 samples were identified as *S. aureus* (6 isolates) and *S. pseudintermedius* (5 isolates). The resistance tests revealed that 36% were resistant to tetracycline, cefoxitin (27%), oxacillin and erythromycin (9%). Screening of methicillin resistance with ORSAB indicated that all isolates were methicillin resistances (100%). Detecting the *mecA* gene encoding methicillin resistance showed that 81.81% of isolates were resistant to methicillin, with detail *S. aureus* (all 6 isolates) and *S. pseudintermedius* (4 isolates). Based on the antibiogram, ORSAB, and *mecA* gene detection, it could be confirmed that three isolates were MRSP, and six isolates were MRSA. The results of this study indicate the high occurrence of methicillin-resistant strains in pets that have the potential zoonotic spread to other animals and humans.

Keywords: antimicrobial resistance; cat; dog; MRSA; MRSP

Abstrak

Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) dikenal sebagai bakteri yang resisten terhadap berbagai antibiotik. Penularan MRSA terjadi antara manusia dan juga kontak langsung manusia dengan anjing maupun kucing. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menganalisis resistensi bakteri terhadap antibiotik secara fenotip dan genotip dari sampel kasus klinis anjing dan kucing di Yogyakarta. Isolat bakteri diidentifikasi melalui uji biokimia dan identifikasi molekuler gen spesies spesifik 23S rRNA dan *nuc* dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan gen *pta* dengan *PCR-restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Bakteri diuji resistensi terhadap beberapa antibiotik dengan uji *disk diffusion Kierby-Bauer*. Resistensi terhadap methicillin dilakukan skrining dengan *oxacillin resistance agar base* (ORSAB) dan dikonfirmasi dengan deteksi gen

mecA. Berdasarkan uji biokimia dan identifikasi molekuler menunjukkan bahwa 11 sampel teridentifikasi *S. aureus* (6 isolat) dan *S. pseudintermedius* (5 isolat). Hasil uji resistensi terhadap 5 jenis antibiotik menunjukkan 36% resisten terhadap tetracyclin, cefoxitin (27%), oxacillin dan eritromycin (9%). Hasil skrining dengan ORSAB terindikasi semua isolat (100%) resisten terhadap *methicillin*. Hasil deteksi gen *mecA* yang mengkode resistensi methicillin menunjukkan bahwa 81,81% isolat resisten terhadap methicillin, dengan rincian *S. aureus* (ke-6 isolat) dan *S. pseudintermedius* (4 isolat). Berdasarkan hasil uji antibiogram, skrining ORSAB, dan deteksi gen *mecA*, dapat dipastikan bahwa tiga isolat merupakan MRSP, dan enam isolat merupakan MRSA. Hasil penelitian ini menunjukkan tingginya kejadian strain resisten methicillin pada hewan peliharaan yang berpotensi menyebar secara zoonosis ke hewan lain dan manusia.

Kata kunci: antimicrobial resistance; anjing; kucing; MRSA; MRSP

Pendahuluan

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri patogen oportunistik, bakteri ini normal pada permukaan kulit, saluran pernapasan, pencernaan, dan urogenital, namun dapat menjadi patogen (Saeed *et al.*, 2022). *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap *methicillin* ditemukan pada tahun 1961 dan biasa disebut dengan *Methicillin resistant S. aureus* (MRSA) Sejak saat itu, infeksi yang disebabkan oleh MRSA terus meningkat (Turner *et al.*, 2019). Menurut *World Health Organization* (WHO) (2013) MRSA merupakan penyebab masalah kesehatan yang utama, dikarenakan telah terjadi sekitar 40% infeksi pada manusia yang disebabkan oleh MRSA di negara maju. Hal tersebut menjadi sesuatu yang harus diperhatikan karena infeksi yang disebabkan oleh MRSA pada hewan maupun manusia dapat mengganggu proses penyembuhan luka, meningkatkan mortalitas dan morbiditas (Fitrandi *et al.*, 2023).

Staphylococcus aureus dapat menjadi penyebab penyakit seperti mastitis, *omphalitis*, *botryomycosis*, dan bakterimia pada hewan (Saeed *et al.*, 2022). Infeksi bakteri MRSA pada hewan ternak dikhawatirkan dapat menyebar ke manusia melalui kontak langsung dengan hewan maupun melalui produk pangan asal hewan (Fitrandi *et al.*, 2023). Hewan dapat berperan sebagai reservoir yang menularkan *S. aureus* ke manusia. Hewan kesayangan seperti anjing, kucing, kelinci, dan marmut telah dilaporkan terinfeksi MRSA. Kedekatan hewan kesayangan dengan manusia melalui kontak langsung dapat menjadi salah satu sumber penularan MRSA antara hewan dan manusia (Afnani *et al.*, 2022). Studi terkini menyatakan

telah muncul bakteri resisten pada hewan yang dikenal dengan *Methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP). Bakteri ini mampu menginfeksi kulit dan gigi hewan, serta merupakan patogen yang bersifat zoonosis. *Methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius* banyak ditemukan pada anjing, manusia dilaporkan dapat terinfeksi MRSP melalui kontak langsung dengan hewan kesayangan seperti anjing namun kejadian kolonisasi di manusia tidak diketahui secara pasti, karena bakteri ini sering diidentifikasi sebagai *S. aureus* (Carroll *et al.*, 2021). Strain MRSP telah resisten terhadap berbagai obat seperti golongan *beta lactam* (sefalekssin, amoksisiklav, cefovecin), klindamisin, fluorokuinolon, dan kloramfenikol (Worthing *et al.*, 2018), sehingga dengan sifat resistensinya bakteri ini sulit untuk diobati. Sifat *Multi-drug resistant* (MDR) yang dimiliki oleh MRSA maupun MRSP mampu menyebabkan wabah yang sulit dikendalikan.

Methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius ditemukan sebagai bakteri patogen yang diperoleh dari rumah sakit hewan dan klinik hewan, hal ini pertama kali dilaporkan di Amerika Utara pada tahun 2001, kemudian dilaporkan di Eropa pada tahun 2007 (Duijkeren *et al.*, 2011). Lima dari 14 (36%) anjing dan 4 dari 13 (31%) kucing ditemukan positif MRSP akibat kontak dengan hewan terinfeksi, di antara petugas di klinik hewan 4 dari 141 (3%) adalah MRSP positif. Penelitian mengenai penularan MRSA dan MRSP pada praktik dokter hewan dilakukan di rumah sakit hewan, Sydney, Australia, hasil penelitian menunjukkan 4% petugas positif MRSA dan 7% pasien anjing positif MRSP (Carroll *et al.*, 2021). Hasil investigasi dari 36 MRSP yang diisolasi dari

lingkungan (21), anjing (14), dan manusia (1) di *Veterinary Teaching Hospital*, 13 dari 36 isolat memiliki pola antibiogram yang sama.

Infeksi MRSA termasuk dalam *emerging infectious pathogen* yang dapat menyebar melalui kontak antara tenaga kesehatan yang terinfeksi dengan pasien di rumah sakit sebagai infeksi nosokomial (Walther *et al.*, 2006). Masalah infeksi nosokomial di dunia veteriner juga dilaporkan semakin meningkat. Laporan infeksi nosokomial di dunia veteriner yang disebabkan oleh MRSA maupun MRSP telah menjadi hal yang cukup serius di rumah sakit hewan USA (Gronthal *et al.*, 2014).

Kajian mengenai keberadaan strain *methicillin resistant* baik MRSA maupun MRSP khususnya pada kasus klinis hewan kesayangan belum banyak dilakukan di Indonesia. Tingginya risiko penularan MRSA melalui rumah sakit maupun lingkungan (komunitas) menjadikan permasalahan infeksi MRSA dan MRSP merupakan permasalahan penting untuk dicegah melalui pendekatan *One Health*, melalui satu kesehatan hewan, manusia, dan lingkungan. Kajian mengenai kasus klinis hewan kesayangan yang terinfeksi MRSA dan MRSP berupa karakteristik fenotipik, antibiogram, dan genotipik menjadi suatu hal yang penting.

Deteksi molekuler dilakukan dengan mendeteksi gen spesies spesifik seperti 23S rRNA, *nuc*, dan *pta*. Gen 23S rRNA merupakan bagian penting pada proses sintesis protein, selain itu urutan basa nukleotidanya sangat identik pada hampir semua bakteri sehingga dapat digunakan untuk identifikasi genus dan spesies (Aziz *et al.*, 2020). Gen *nuc* merupakan gen penyandi enzim *thermonuclease* yang merupakan faktor virulensi dan karakter penting pada *S. aureus* sehingga gen ini sering digunakan untuk membedakan *S. aureus* dengan *Staphylococcus sp.* lainnya (Juwita *et al.*, 2022), selain itu menurut Moses *et al.* (2023) membedakan *S. aureus* dengan *S. pseudintermedius* dapat menggunakan gen *nuc*. Gen *pta* milik *S. pseudintermedius* memiliki situs retriksi enzim *MboI* sedangkan bakteri lain yang termasuk *Staphylococcus Intermedius Group* (SIG) tidak memiliki situs tersebut sehingga deteksi gen *pta* menggunakan metode PCR RFLP dilakukan untuk membedakan *S. pseudintermedius* dengan SIG. Penelitian ini

juga mendeteksi gen penyandi resistensi yaitu gen *mecA*, gen ini merupakan penyandi protein *Penicillin Binding Protein 2a* (PBP2a) yang bertanggung jawab terhadap penurunan afinitas terhadap pengikatan antibiotik *beta lactam*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi dan menganalisis resistensi *S. aureus* dan *S. pseudintermedius* secara fenotip dan genotip yang diperoleh dari sampel klinis hewan kesayangan di Yogyakarta. Hasil dari karakterisasi dan analisis diharapkan dapat membantu pemetaan infeksi sehingga dapat digunakan untuk penanganan dan pencegahan penyebaran antimikrobial resisten.

Materi dan Metode

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa swab oronasal, telinga, dan luka pada kulit dari pasien anjing dan kucing di wilayah Yogyakarta. Swab diambil dari anjing dan kucing yang menunjukkan gejala klinis seperti otitis eksterna bernanah (indikatif infeksi bakteri), pasien dengan luka terbuka maupun tertutup dengan nanah, luka pasca operasi atau pasca penanganan medis yang terinfeksi, luka infestasi ektoparasit yang mengalami infeksi sekunder, infeksi saluran urogenital dan pasien dengan diagnosa infeksi virus yang disertai infeksi sekunder bakteri.

Isolasi bakteri dilakukan dengan kultur pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA) yang kemudian diinkubasi 35°C selama 24 jam. Hasil kultur pada media MSA diamati morfologi koloni dari bakteri. Koloni terduga dilakukan konfirmasi morfologi sel dengan pengecatan Gram. Bakteri terduga dilakukan pemurnian, dikultur pada Plat Agar Darah (PAD), dan dilakukan uji biokemis seperti katalase, *coagulase*, dan *Voges Proskauer* (VP).

Isolat bakteri yang terindikasi sebagai MRSA dan MRSP dilakukan purifikasi DNA untuk dilakukan uji molekuler. Purifikasi menggunakan QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Germany). Sampel yang sudah diekstraksi DNA-nya, kemudian dilakukan deteksi molekuler. Deteksi dilakukan dengan mengamplifikasi gen 23S rRNA, *pta*, *nuc*, dan *mecA* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Primer yang digunakan tersaji di Tabel 1. *Polymerase chain reaction* mix terdiri dari 1 µL primer *forward*,

Tabel 1. Primer gen 23S rRNA, *pta*, *nuc*, dan *mecA* (Afshar *et al.*, 2023; Bannoehr *et al.*, 2009; Salasia *et al.*, 2011)

Target gen	Sequence (5'-3')	Ukuran (bp)
23S rRNA	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1250
<i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>)	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT ACG CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	267
<i>nuc</i> (<i>S. pseudintermedius</i>)	TRG GCA GTA GGA TTC GTT AA CTT TTG TGC TYC MTT TTG G	926
<i>pta</i>	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG	320
<i>mecA</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	532

1 µL primer *reverse*, 12,5 µL PCR mix MyTaq red mix, 2 µL *template* DNA hasil ekstrasi, dan 8,5 µL aquabides. Amplifikasi dilakukan di dalam *thermal cycler*. Hasil dari amplifikasi dimasukkan ke dalam sumuran gel *agarose* dengan konsentrasi 1,5% yang kemudian dilakukan elektroforesis dengan menggunakan DNA *ladder* 100bp sebagai marker. Pita yang divisualisasikan menggunakan *Redsafe staining* diamati menggunakan transiluminasi ultraviolet.

Hasil amplifikasi gen *pta* dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan metode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dengan enzim restriksi *MboI* (10 U/µL, Thermo Scientific, USA). Produk hasil amplifikasi gen *pta* sebanyak 10 µL, ddH₂O 18 µL, *reverse buffer* 2 µL, dan *MboI* 2 µL dimasukkan ke dalam PCR tube 0,2 ml. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex*, kemudian dilakukan *spin down*. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Hasil inkubasi dilakukan elektroforesis dengan 2% gel *agarose* (GeneDirex, USA). Sumuran pertama dimasukkan 2 µL DNA *ladder* 100 bp (Invitrogen, USA). Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV *transilluminator*.

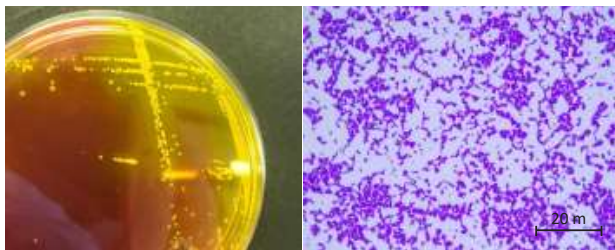
Isolat bakteri yang telah teridentifikasi dengan uji biokemis maupun molekuler dilakukan *Screening methicillin* resisten dan uji resistensi antibiotik. *Screening methicillin* resisten dilakukan dengan kultur bakteri pada media ORSAB yang kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam. Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan mengkultur bakteri yang sudah teridentifikasi sebagai *S. aureus* maupun *S. pseudintermedius* di media *Mueller Hinton*

Agar (MHA) dengan metode *Kirby-Bauer*. Disk antibiotik yang digunakan adalah *oxacillin* (OX) 5 µg, *tetracyclin* (TE) 30 µg, *erythromycin* (E) 15 µg, *Cefoxitin* (FOX) 30 g, dan *Ciprofloxacin* (CIP) 5 µg.

Hasil dan Pembahasan

Tiga puluh sembilan sampel diperoleh dari anjing dan kucing yang menunjukkan gejala klinis dengan indikasi infeksi *S. aureus* dan *S. pseudintermedius* di Yogyakarta. Menurut Quinn *et al.* (2011) *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi saluran respirasi atas dan peradangan bernanah pada telinga dan kulit pada anjing dan kucing. Penyakit yang disebabkan oleh *S. pseudintermedius* pada anjing dan kucing antara lain pyoderma, otitis eksterna, *Urinary Tract Infections* (UTI), infeksi pada saluran pernapasan dan saluran reproduksi (Lynch dan Helbig, 2021). Dua puluh dua dari tiga puluh sembilan sampel (56,4%) berasal dari kucing, dengan 72,72% diperoleh dari swab orofaring dan nasal dengan gejala infeksi saluran pernafasan, 18,1% diperoleh dari swab lesi kulit luka bernanah, 4,54% diperoleh dari swab mata dengan gejala konjungtivitis, dan 4,54% diperoleh dari swab perineal dari hewan yang menunjukkan gejala infeksi pada saluran reproduksi. Sebanyak 63,63% kucing di diagnosa infeksi virus dengan infeksi sekunder. Tujuh belas dari tiga puluh sembilan sampel (43,5%) berasal dari anjing, dengan 41,1% diperoleh dari swab orofaring dan nasal, 29,4% diperoleh dari swab perineal, 23,5% diperoleh dari swab lesi pada kulit dan vagina, dan 17,6% diperoleh dari swab telinga.

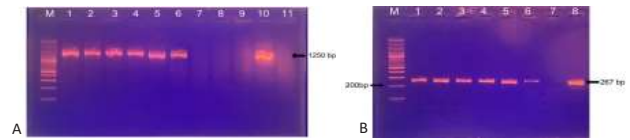
Sampel dilakukan kultur pada media selektif MSA. Morfologi koloni dari *Staphylococcus* biasanya berwarna putih, buram, dengan diameter 4 mm (Quinn *et al.*, 2011). Koloni *S. aureus* maupun *S. pseudintermedius* berwarna kuning pada media MSA karena bakteri tersebut dapat menfermentasi mannitol (Markey *et al.*, 2013). Morfologi sel *Staphylococcus* berbentuk kokus, bergerombol seperti anggur, dan berwarna ungu pada pengecatan Gram (Quinn *et al.*, 2011). Sebelas sampel dari 39 isolat menunjukkan koloni berwarna kuning pada media MSA, koloni terpisah dilakukan pengecatan Gram untuk mengkonfirmasi bentuk sel. Morfologi koloni dan sel disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi koloni *S. aureus* pada media MSA dan Morfologi sel *S. aureus* pada mikroskop perbesaran 1000x

Morfologi koloni dan sel yang sesuai dilakukan re-kultur pada media MSA hingga menjadi biak murni yang ditandai dengan morfologi koloni dan sel yang seragam. Biak murni dilakukan uji biokemis berupa uji katalase, koagulase, dan VP. Hasil identifikasi bakteri dengan uji biokemis menunjukkan bahwa dari 11 isolat terdapat 6 isolat teridentifikasi *S. aureus* dan 5 isolat teridentifikasi *S. pseudintermedius*. Isolat terduga *S. aureus* dan *S. pseudintermedius* dilakukan deteksi secara molekuler. Deteksi *S. aureus* dilakukan dengan mendeteksi 23S rRNA yang dapat digunakan untuk identifikasi genus dan spesies (Aziz *et al.*, 2020) serta gen *nuc* yang dapat membedakan *S. aureus* dan *Staphylococcus sp.* lainnya (Juwita *et al.*, 2022). Primer 23S rRNA yang digunakan merupakan primer spesies *S. aureus* dengan ukuran 1250 bp (Aziz *et al.*, 2020), hasil visualisasi dengan elektroforesis enam isolat yang dilakukan PCR dengan primer tersebut menunjukkan bahwa 6 sampel tersebut terkonfirmasi positif terhadap gen 23S rRNA dengan terbentuknya pita dengan

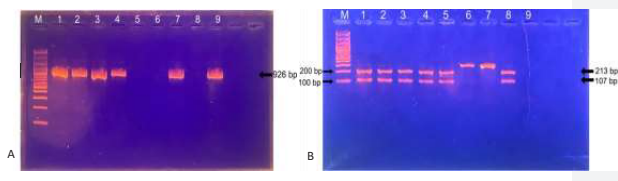
ukuran 1250 bp (Gambar 2). Keenam sampel positif terhadap gen 23S rRNA dilakukan deteksi gen *nuc S. aureus*. Hasil elektroforesis amplikon gen *nuc S. aureus* keenam sampel terkonfirmasi positif terhadap gen *nuc* dengan terbentuknya pita dengan ukuran 267 bp.



Gambar 2. Hasil elektroforesis (a) ampikon gen 23s rRNA isolat *S. aureus*. Lane 1-9 sampel, lane 10 kontrol positif, lane 11 kontrol negatif. Hasil menunjukkan adanya pita DNA ukuran 1250 bp pada lane 1-6. (b) ampikon gen *nuc* isolat *S. aureus*. Lane 1-6 sampel, lane 8 kontrol positif, lane 7 kontrol negatif. Hasil menunjukkan adanya pita DNA ukuran 267 bp pada lane 1-6.

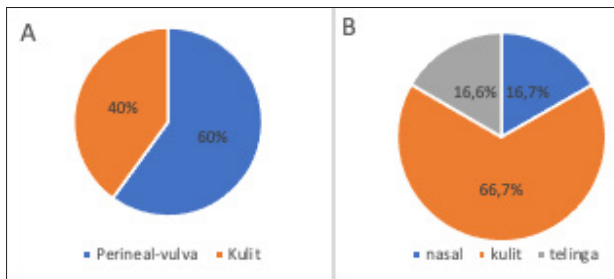
Staphylococcus pseudintermedius sulit dibedakan dengan *S. aureus* karena memiliki karakter fenotipe yang mirip, sehingga *S. pseudintermedius* sering diidentifikasi sebagai *S. aureus* (Bibby dan Brown, 2021), sehingga deteksi molekuler diharapkan dapat membantu untuk mengidentifikasi *S. pseudintermedius* secara lebih spesifik. Menurut Moses *et al.* (2023) dan Bannoehr *et al.* 2009 untuk mendeteksi *S. pseudintermedius* secara molekuler dapat menggunakan gen *nuc* dan PCR-RFLP pada gen *pta*. Hasil Elektroforesis ampikon gen *nuc S. pseudintermedius* menunjukkan lima dari sebelas sampel terbentuk pita yang berukuran 926 bp (Gambar 3a). Hasil elektroforesis PCR RFLP gen *pta* terlihat adanya dua pita yang berukuran 213 bp dan 107 bp (Gambar 3b). Menurut Bannoehr *et al.* (2009) dan Kang *et al.* (2014) produk gen *pta* berukuran 320 bp, gen *pta* milik *S. pseudintermedius* memiliki situs restriksi enzim *MboI* sedangkan bakteri SIG (*Staphylococcus Intermedius Group*) tidak memiliki situs tersebut, sehingga ketika gen *pta S. pseudintermedius* ditambahkan enzim *MboI* akan terpotong dan menghasilkan dua pita ketika di elektroforesis. Kedua ukuran pita tersebut adalah 213 bp dan 107 bp. Pita yang tidak terpotong menunjukkan kemungkinan sampel tersebut termasuk kedalam SIG selain *S. pseudintermedius*. Sampel yang menunjukkan pita tidak terpotong memiliki hasil uji fenotipe yang serupa dengan kelima sampel lainnya

yang telah terkonfirmasi *S. pseudintermedius* sehingga untuk mengetahui spesies dari kedua isolat tersebut harus dilakukan uji biokimia lain yang dapat membedakan spesies yang SIG ataupun mendeteksi gen spesies spesifik bakteri SIG lainnya selain *S. pseudintermedius*.



Gambar 3. Hasil elektroforesis (a) ampikon gen *nuc* isolat *S. pseudintermedius*. Lane 1-7 sampel, lane 9 kontrol positif, lane 8 kontrol negatif. Hasil menunjukkan adanya pita DNA ukuran 267 bp pada lane 1, 2, 3, 4, dan 7. (b) PCR-RFLP dengan enzim *MboI* gen *pta* isolat *S. pseudintermedius*. Lane 1-7 sampel, lane 8 kontrol positif, lane 9 kontrol negatif. Hasil menunjukkan adanya dua pita DNA ukuran 213 dan 107 bp pada lane 1, 2, 3, 4, 5 dan 8 serta satu pita ukuran 320 bp pada 6 dan 7

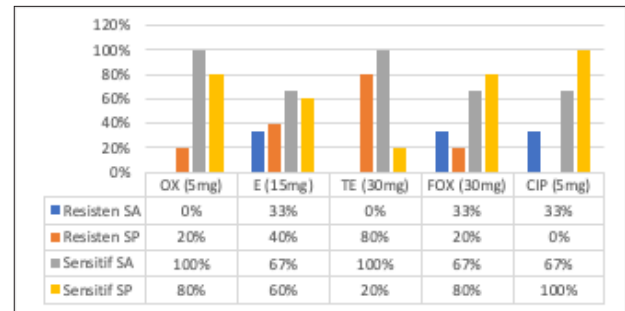
Sebelas isolat yang terkonfirmasi *S. aureus* dan *S. pseudintermedius* berasal dari satu kucing dan sepuluh anjing. Sampel terkonfirmasi didapatkan dari swab berbagai lesi yang disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. (a) Diagram asal sampel isolat *S. pseudintermedius* (b) asal sampel isolat *S. aureus*

Hasil kultur isolat pada media ORSAB 11 isolat dapat tumbuh pada media dan koloni berwarna biru. Media ini terdapat inhibitor berupa *oxacillin* 2 mg/L dan *polymyxin B* 50.000 IU/L, sehingga koloni yang dapat tumbuh pada media ini diindikasikan sebagai kelompok *methicillin-resistant*. Koloni yang berwarna biru diinterpretasikan sebagai bakteri dapat fermentasi mannitol sehingga menyerap warna *aniline blue* pada media (Kluytmans *et al.*, 2002 dan Blanc *et al.*, 2003). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa 11 sampel merupakan bakteri yang resisten terhadap *methicillin*. Uji *disk diffusion* dilakukan menggunakan lima

jenis antibiotik meliputi *Oxacillin* 5 g (OX), *Erytromycin* 15 g (E), *Tetracycline* 30 g (TE), *Cefoxitin* 30 g (FOX), dan *Ciprofloxacin* 5 g (CIP). Hasil uji *disk diffusion* menunjukkan terbentuknya zona inhibisi disekitar *disk* antibiotik yang kemudian diameter dari zona inhibisi diukur dan dibandingkan dengan data pada CLSI, data diinterpretasikan dalam dua kategori resisten dan sensitif (Gambar 5).



Gambar 5. Data uji disk diffusion *S. aureus* dan *S. pseudintermedius*

Hasil uji antibiogram terhadap lima antibiotik menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang resisten terhadap *Erytromycin* sebanyak 36,36% (4/11), lebih banyak dibandingkan dengan antibiotik lainnya, sedangkan jumlah bakteri yang resisten terhadap *oxacillin* hanya 9,09% (1/11). Data tersebut juga menunjukkan bahwa sebagian besar isolat bakteri masih sensitif terhadap kelima antibiotik tersebut. Hal tersebut dapat disebabkan karena sampel diambil dari hewan yang belum pernah dilakukan pengobatan antibiotik, sehingga bakteri yang diduga menjadi penyebab sakit merupakan bakteri yang masih sensitif terhadap antibiotik yang diujikan. Menurut Ventola (2015) bahwa resistensi antibiotik muncul dikarenakan penggunaan antibiotik yang tidak tepat secara dosis maupun waktu penggunaan, hal tersebut memberikan kesempatan untuk bakteri dapat beradaptasi terhadap kecaman antibiotik dan menghasilkan bakteri yang kebal terhadap antibiotik. Data uji *disk diffusion* juga menunjukkan bahwa terdapat satu dari sebelas isolat yang merupakan MDR karena resisten terhadap OX, E, dan TE. Menurut CDC bakteri dikatakan MDR ketika resisten setidaknya satu antibiotik dalam tiga atau lebih golongan antibiotik.

Screening yang dilakukan dengan media ORSAB menunjukkan bahwa 100% bakteri terduga merupakan bakteri yang termasuk kedalam kelompok *methicillin-resistant*, namun setelah dilakukan uji *disk diffusion* hanya satu bakteri yang sebelumnya teridentifikasi *S. pseudintermedius* dan termasuk kedalam kelompok yang resisten terhadap *Oxacillin* (MRSP). Dua isolat yang teridentifikasi *S. aureus* termasuk kedalam kelompok yang resisten terhadap *Cefoxitin*. Menurut CLSI bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap *cefoxitin* dapat dikategorikan kedalam MRSA. Sehingga berdasarkan uji ini terdapat satu isolat MRSP dan dua isolat MRSA. Penelitian yang dilakukan oleh Blanc *et al.* (2003) mengenai evaluasi terhadap *screening* MRSA menggunakan ORSAB menyatakan bahwa hanya 42% dari keseluruhan sampel yang benar terkonfirmasi merupakan MRSA. Hal tersebut dapat dikarenakan tidak hanya *S. aureus* yang dapat menfermentasi mannitol dan resisten terhadap *oxacillin*, sehingga dibutuhkan uji lain untuk konfirmasi.

Sebelas sampel terkonfirmasi secara genotipe dan fenotipe telah dilakukan *screening* menggunakan media ORSAB untuk *screening methicillin* resisten (MRSA dan MRSP). Resistensi terhadap methicillin dapat dideteksi dengan gen *mecA* yang merupakan gen penyandi *penicillin binding protein* (PBP2a) yang menyebabkan afinitas bakteri terhadap antibiotik golongan beta lactam menjadi rendah. Hasil elektroforesis ampikon gen *mecA* menunjukkan bahwa sembilan dari sebelas sampel terbentuk pita berukuran 532 bp. Hal tersebut menandakan bahwa 81,81% membawa gen resistensi terhadap antibiotik golongan beta lactam. Hasil deteksi gen *mecA* dibandingkan dengan hasil uji *disk diffusion* yang hanya terdapat satu bakteri secara fenotipe resisten terhadap *oxacillin* sedangkan bakteri lainnya masih dikategorikan sensitif terhadap *oxacillin*. Menurut Stasiak *et al.* (2021) terjadinya perbedaan genotipe dengan fenotipe terhadap resistensi bukanlah hal yang jarang terjadi, beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa beberapa bakteri terdeteksi membawa gen resistensi namun tidak terekspresikan. Hal tersebut dapat disebabkan karena *silent gene* dimana

suatu bakteri membawa gen resistensi namun tidak terekspresikan secara fenotipe atau diekspresikan pada tingkat yang sangat rendah sehingga tidak teramati. Fenomena *silent gene* ini dapat menjadi fenotipe resistensi baru dimana bakteri yang secara fenotipe masih sensitif terhadap antibiotik tertentu harus diperhitungkan. Hal tersebut dikarenakan gen resistensi dapat ditularkan ke bakteri lainnya yang memungkinkan dapat terekspresi apabila didalam bakteri lain.

Kesimpulan

Dari 11 (sebelas) sampel yang diperoleh dari swab nasal, perineal-vulva, kulit, dan telinga anjing dan kucing terisolasi dan teridentifikasi 6 (enam) *S. aureus* dan 5 (lima) *S. pseudintermedius* secara fenotipik dan genotipik. Hasil uji antibiogram, ORSAB, dan deteksi gen *mecA* dapat diketahui 54,5% (6/11) termasuk strain MRSA; 27,2% (3/11) termasuk strain MRSP dan 18,3% (2/11) termasuk MSSP. Satu isolat MRSP merupakan bakteri *multidrug-resistant*.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian melalui beasiswa Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) 2024 dengan No. 048/E5/PG.02.00.PL/2024.

Daftar Pustaka

- Afnani, D.A., Fatih, N., Effendi, M.H., Tyasningsih, W., Khairullah, A.R., Kurniawan, S.C., Silaen, O.S.M., Ramandinianto, S.C., Widodo, A., Riwu, K.H.P. (2022). Profil of Multidrug Resistance and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from cats in Surabaya, Indonesia. Biodiversitas 23 (11): 5703-5709
- Afshar, M.F., Zakaria, Z., Cheng, C.H., Ahmad, N.I. (2023). Prevalence and multidrug-resistant profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs, cats, and pet

- owners in Malaysia. *Veterinary World* 16 (3): 536-545
- Aziz, F., Lestari, F.B., Nuraida S., Purwati, E., Salasia, S.I.O. (2020). Deteksi *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus sp.* secara Langsung dari susu segar Kambing Peranakan Etawa dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Sain Veteriner* 38 (2): 168 - 174
- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. (2009). Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 47(2):469-71
- Bannoehr, J., & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, 23 4, 253-66, e51-2 .
- Bibby HL, Brown KL. (2021). Identification of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Wound Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improves Accuracy of Susceptibility Reporting at an Increase in Cost. *J Clin Microbiol* 59(11): 1-11
- Blanc DS, Wenger A, Bille J. (2003). Evaluation of a novel medium for screening specimens from hospitalized patients to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 41(8):3499-502.
- Carroll, K.C., Burnham, C-A.D., Westvlade, L.F. (2021). From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS Pathog* 17(12): e1009961
- Duijkeren, E. V., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyorala, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., Torneke, K (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*., *J.Antimicrob Chemother*. 66: 2705-2714
- Fitrandi, M. , Salasia, S.I.O. , Sianipar, O., Dewananda, D.A., Arjana, A.Z., Aziz, F., Wasissa, M., Lestari, F.B. , Santosa, C.M. (2023). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates derived from humans and animals in Yogyakarta, Indonesia. *Veterinary Wolrd* 16: 239-245
- Gro'nthal, T., Moodley A.,Nyka, S. Senoja, Junnila, J., Guardabassi, L., Thomson, K., Rantala, M. (2014). Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From Outbreak Control to Outbreak Prevention. *PLoS ONE* 9(10): e110084
- Juwita, S., Indrawati, A., Damajanti, R., Safika, S., Mayasari, N.L.P.I. (2022). Genetic relationship of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, animals, environment, and Dangke products in dairy farms of South Sulawesi Province, Indonesia. *Veterinary World* 15 (5): 558 - 564
- Kang MH, Chae MJ, Yoon JW, Kim SG, Lee SY, Yoo JH, Park HM. (2014). Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J Vet Sci* 15(3):409-15
- Kluytmans J, Van Griethuysen A, Willemse P, Van Keulen P. (2002). Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. *J Clin Microbiol*. 40 (7) : 2480-2.
- Lynch SA, Helbig KJ. (2021). The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Vet Sci* 8(1):11
- Markey, B.K., Leonard, F.C., Archambault, M. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology 2nd edition*. Mosby Elsevier
- Moses IB, Santos FF, Gales AC. (2023). Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. *Microorganisms* 11(3):581

- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Fitzpatrick, E. S., Fanning, S. and Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Saeed, M.M., Yasir, J.O.A., Hussein, A.N., Hassan, R.M. (2022). A review of animal diseases caused by staphylococci. *Revista Latinoamericana de Hipertension* 17 No 1
- Salasia S.I.O. Tato S, Sugiyono N, Ariyanti D, Prabawati F. (2011). Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. *J Vet Sci*. 12(4):353-61
- Stasiak M, Maćkiw E, Kowalska J, Kucharek K, Postupolski J. (2021). Silent Genes: Antimicrobial Resistance and Antibiotic Production. *Pol J Microbiol* 70(4):421-429
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A. *et al.* (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 17,203-2018
- Ventola CL. (2015) . The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 40(4):277-83
- Walther B, Friedrich AW, Brunnberg L, Wieler LH, Lübke-Becker A. (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veterinary medicine: a “new emerging pathogen”?. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 119(5-6):222-32.
- Worthing, K.A., Brown, J., Gerber, L., Trott, D.J., Abraham, S., Norris, J.M. (2018). Methicillin-resistant staphylococci amongst veterinary personel, personnel-owned pets, patients and the hospital environment of two small animal veterinary hospitals. *Veterinary Microbiology*, 223, 79-85