

Karakterisasi *Staphylococcus aureus* Isolat Susu Sapi Perah Berdasar Keberadaan Protein-A pada Media Serum Soft Agar terhadap Aktivitas Fagositosis Secara *In Vitro*

Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Dairy Cows Based on Existence of Protein-A in Serum Soft Agar Medium Toward In Vitro Phagocytosis Activity

Fajar Budi Lestari¹, Siti Isrina Oktavia Salasia²

¹ Program Studi Diploma III Kesehatan Hewan, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada

² Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Email : drh.fajar.bl@gmail.com

Abstract

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) is recognized as a major pathogen causing mastitis. Protein-A is an important factor for adhesion and colonization in the host cell. The aims of the research were to know relationship of phagocytosis activity of *S. aureus* toward existence of protein-A in serum soft agar medium. Nineteen isolates *S. aureus* from dairy cows milk in West Java and Central Java were used in this research. Identification of 19 isolates based on hemolysin in blood agar, Gram staining, mannitol fermentation, catalase and coagulase test. Characterization of *S. aureus* based on morphology colonies in serum soft agar medium that contain of rabbit serum to know the existence of protein-A. Leucocytes polymorphonuclear from rabbit were used to phagocytosis test based on the existence of protein A. All isolates were identified as *S. aureus*. All of them are Gram positive, fermented mannitol, catalase positive, 15,79% coagulase negative, 84,21% coagulase positive. In serum soft agar medium 12 isolates (63,16%) showed compact-colonies, 7 isolates (36,84%) showed diffuse-colonies. Strain with protein-A grew compactly, strain without or undetectable protein-A grew diffusely. The result of phagocytosis test show that leucocytes polimorphonuclear phagocyte *S. aureus* with protein-A lower (2,99 bacteria/cell) than *S. aureus* without or undetectable protein-A (3,85 bacteria/cell). *Staphylococcus aureus* with protein-A is more virulent than *S. aureus* without or undetectable protein-A. Based on hemolysin, coagulase and protein-A, *S. aureus* from Central Java is more virulent than *S. aureus* from West Java.

Keyword : *Staphylococcus aureus*, dairy cow, serum soft agar, protein-A, phagocytosis

Abstrak

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri penyebab utama mastitis. Protein-A berperan penting dalam adesi dan kolonisasi bakteri pada sel inang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan aktivitas fagositosis *S. aureus* berdasarkan keberadaan protein-A pada media *serum soft agar*. Sebanyak 19 isolat *S. aureus* susu sapi perah asal Jawa Barat dan Jawa Tengah digunakan pada penelitian ini. Seluruh isolat tersebut diidentifikasi dengan dipupuk pada media plat agar darah (PAD), koloni bakteri kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, uji *mannitol salt agar* (MSA), katalase dan uji koagulase. Karakterisasi *S. aureus* dilakukan dengan menanam bakteri pada media *serum soft agar* (SSA) yang mengandung serum kelinci untuk mengetahui keberadaan protein-A, kemudian dilakukan uji fagositosis dengan menggunakan sel polimorfonuklear. Dari 19 isolat tersebut seluruhnya teridentifikasi sebagai *S. aureus* yang ditunjukkan dengan Gram positif, sel berbentuk kokus bergerombol, mampu memfermentasi manitol pada media MSA, positif pada uji katalase, 15,79% sampel menunjukkan hasil koagulase negatif, sedangkan 84,21% menunjukkan hasil koagulase positif. Pertumbuhan pada media SSA menunjukkan hasil 12 isolat (63,16%) koloni berbentuk kompak dan 7 isolat (36,84%) koloni berbentuk difus. Koloni kompak menunjukkan bakteri tersebut memiliki protein-A, koloni difus menunjukkan bakteri tersebut tidak memiliki protein-A atau memiliki protein-A tetapi tertutup oleh kapsul. Hasil uji fagositosis menunjukkan *S. aureus* yang memiliki protein-A lebih sedikit difagosit oleh leukosit polimorfonuklear (2,99 bakteri/sel) dari pada *S. aureus* yang tidak memiliki protein-A, atau mempunyai protein-A tetapi tertutup oleh kapsul (3,85 bakteri/sel). *Staphylococcus aureus* yang memiliki protein-A lebih patogen daripada *S. aureus* yang tidak memiliki protein-A. Isolat *S. aureus* asal Jawa Tengah lebih virulen dibandingkan isolat *S. aureus* asal Jawa Barat ditinjau dari sifat hemolisis, koagulase, dan protein-A.

Kata Kunci : *Staphylococcus aureus*, sapi perah, *serum soft agar*, protein-A, fagositosis

Pendahuluan

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab utama mastitis pada sapi dan kejadian mastitis sering diasosiasikan dengan infeksi *S. aureus*. Bakteri *S. aureus* merupakan patogen utama yang sering menyebabkan mastitis subklinis dan kronis. Mastitis yang disebabkan oleh *S. aureus* sangat sulit untuk dikontrol oleh pengobatan (Jones, 1998), dan angka kejadian mastitis akibat *S. aureus* merupakan angka kejadian tertinggi (Morin dan Hurley, 2003). Di Indonesia, tingginya angka mastitis mengakibatkan banyaknya kerugian peternak. Salah satu faktor virulensi yang penting dalam proses infeksi awal mastitis pada sapi adalah protein-A dari *S. aureus* (Budiarto dan Effendi, 2008). Karakter permukaan bakteri penting untuk dipelajari karena permukaan bakteri adalah sisi yang berinteraksi dengan jaringan inang dan efektor-efektor imun sehingga berperan sebagai kunci dalam proses penyakit (Cunningham *et al.*, 1996). Protein

permukaan salah satunya adalah protein-A, merupakan salah satu faktor yang menentukan karakter permukaan bakteri dan patogenitas *Staphylococci*. Peran protein-A sebagai faktor virulensi yaitu sebagai sarana adesi atau perlekatan bakteri dan kolonisasi, perusakan sel inang, antifagosit dan menurunkan respons imun (Suarsana, 2005). Protein-A dapat berikatan dengan reseptor *fragment crystallizer* (Fc) pada leukosit polimorfonuklear (PMN) sehingga tidak terjadi opsonisasi dan proses fagositosis dihambat, sehingga bakteri dapat cepat menginvasi inang (Cunningham *et al.*, 1996; Wibawan *et al.*, 2005). Metode yang banyak digunakan untuk mempelajari karakter permukaan bakteri adalah teknik *soft agar* (Djannatun, 2002). Menurut Harlow dan Lane (1988), teknik *serum soft agar* dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan protein-A *S. aureus* yang terekspresikan. Bakteri yang memiliki protein-A akan membentuk koloni kompak pada media

serum soft agar yang mengandung serum kelinci, sedangkan bakteri yang tidak memiliki protein-A akan membentuk koloni difus pada media SSA (Djannatun, 2002). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan aktivitas fagositosis *S. aureus* berdasarkan keberadaan protein-A pada media *serum soft agar*.

Materi dan Metode

Reidentifikasi Bakteri

Sebanyak 19 isolat *S. aureus* asal susu sapi perah Jawa Tengah dan Jawa Barat digunakan dalam penelitian ini. Tahap awal identifikasi dilakukan seleksi dengan cara penanaman bakteri pada plat agar darah (PAD), kemudian dilanjutkan seleksi pada *mannitol salt agar* (MSA), pewarnaan Gram dan uji biokimiawi.

Uji Katalase

Biakan murni bakteri pada PAD diambil dengan ose, dan dicampur dengan 2-3 tetes hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas objek. Hasil positif apabila terlihat adanya gelembung-gelembung udara. Hasil uji dibandingkan dengan kontrol negatif berupa campuran hidrogen peroksida dengan NaCl fisiologis (Todari, 2005).

Uji Koagulase

Uji koagulase dilakukan dengan menggunakan tabung yang berisi 0,5 ml biakan cair dalam *Todd Hewitt broth* (TBH) dicampur dengan 0,5 ml plasma kelinci dan diinkubasi selama 6-18 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada 6 jam pertama dan dilanjutkan setelah 18 jam. Bakteri *S. aureus* menunjukkan reaksi positif pada uji koagulase dengan adanya gumpalan seperti gel dalam tabung, dan reaksi negatif apabila tidak terdapat gumpalan

menyerupai gel pada tabung (Fardiaz, 1993; Talaro dan Talaro, 2002).

Uji protein-A pada *serum soft agar* (SSA)

Pembuatan media SSA dilakukan dengan mencampur THB (Oxoid, Jerman) hangat dengan *agar base* (Oxoid, Jerman) cair dan serum kelinci. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 10%. Konsentrasi 10% dibuat dari 9 ml THB dicampur dengan 1 ml agar, lalu ditambahkan 50 µl serum kelinci, kemudian dicampur sampai homogen. Bakteri dari media THB diambil satu ujung ose dengan menggunakan ose runcing, lalu dimasukkan dalam media SSA, kemudian dicampur sampai homogen. Setelah itu, seluruh media diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati setelah 18 jam. Bakteri yang mengandung protein-A maka koloni bakteri pada media SSA yang mengandung serum kelinci berbentuk kompak, sedangkan bakteri yang tidak mengandung protein-A koloni bakteri pada media SSA berbentuk difus (Djannatun, 2002).

Uji Fagositosis

Suspensi yang digunakan untuk uji fagositosis adalah 10^8 bakteri/ml dalam PBS. Sebanyak 10 ml darah kelinci sehat diambil dari *arteri centralis*. Darah disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Diperoleh 3 lapisan dengan susunan dari atas ke bawah yaitu plasma, *buffy coat*, dan sel-sel darah. Lapisan *buffy coat* dan sel-sel darah digunakan sebagai larutan yang mengandung leukosit. Larutan yang mengandung leukosit tersebut diambil sebanyak 100 µl, dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf*, kemudian ditambahkan 100 µl larutan bakteri, dicampur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi kemudian dibuat preparat apus darah,

difiksasi dengan menggunakan methanol dan diwarnai dengan Giemsa 10% selama 30 menit. Indeks fagositosis ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang difagosit oleh setiap sel leukosit polimorfonuklear, dari 50 sel leukosit polimorfonuklear pada setiap preparat apus dengan menggunakan mikroskop (Khusnan dan Salasia,

2006).

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian diperoleh 19 isolat bakteri *S. aureus*. Hasil identifikasi dan karakterisasi *S. aureus* asal Jawa Barat dan Jawa Tengah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil reidentifikasi *Staphylococcus aureus* asal Jawa Barat dan Jawa Tengah

Kode	Asal Isolat	PAD	MSA	Gram	Koagulase	Katalase	SSA	Prot -A
I ₂	Jawa Barat	α	+	+	-	+	Difus	-
I ₄	Jawa Barat	α	+	+	+	+	Kompak	+
P ₁	Jawa Barat	α	+	+	+	+	Kompak	+
P ₅	Jawa Barat	α	+	+	-	+	Difus	-
MJL ₂	Jawa Barat	β	+	+	+	+	Difus	-
Jaed ₂	Jawa Barat	β	+	+	-	+	Kompak	+
Y ₅	Jawa Tengah	β	+	+	+	+	Kompak	+
Y ₇	Jawa Tengah	β	+	+	+	+	Kompak	+
SU ₂	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Difus	-
SU ₁₀	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Kompak	+
SU ₁₆	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Difus	-
SU ₂₄	Jawa Tengah	β	+	+	+	+	Kompak	+
SU ₂₅	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Difus	-
SU ₂₈	Jawa Tengah	α	+	+	+	+	Kompak	+
SU ₃₄	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Kompak	+
SU ₃₉	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Difus	-
SU ₄₇	Jawa Tengah	γ	+	+	+	+	Kompak	+
BY ₅	Jawa Tengah	α	+	+	+	+	Kompak	+
BY ₇	Jawa Tengah	α	+	+	+	+	Kompak	+

Keterangan : PAD : plat agar darah ; MSA : *mannitol salt agar* ; SSA : *serum soft agar* ; Prot-A : Protein-A

Bakteri *S. aureus* isolat sapi perah menunjukkan karakter yang bervariasi dalam memproduksi hemolisin. Pada media PAD dapat dilihat adanya zona hemolisin α , β dan γ . Dari total 19 isolat dapat diamati 7 isolat (36,84%) bersifat α -hemolisin, 5 isolat (26,32%) bersifat β -hemolisin, dan 7 isolat (36,84%) bersifat γ -hemolisin. Dari 19 isolat bakteri yang ditanam pada media MSA seluruhnya dapat memfermentasi manitol,

ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri berwarna kuning emas dan adanya perubahan pada latar belakang media MSA dari warna merah muda menjadi warna kuning. Bakteri *S. aureus* dapat memfermentasi manitol, sedangkan *Staphylococci* yang lain tidak memfermentasi manitol (Boyd dan Morr, 1984). Uji katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococci* dan *Streptococci*. *Staphylococci* memproduksi enzim

katalase, sedangkan *Streptococci* tidak memproduksi enzim katalase (Carter dan Wise, 2004).

Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. aureus* yang dapat menggumpalkan plasma dengan bantuan faktor yang terdapat dalam serum. Oleh karena itu peran koagulase yang dihasilkan oleh *S. aureus* ini dapat digunakan sebagai sarana diagnostik (Brückler *et al.*, 1994). Pada penelitian ini ternyata tidak semua isolat *S. aureus* menunjukkan hasil koagulase positif. Sebanyak 3 isolat (15,79%) menunjukkan hasil koagulase negatif, sedangkan 16 isolat (84,21%) menunjukkan hasil koagulase positif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fox dan Melinda (1996) yang menyatakan bahwa dalam diagnosis mastitis, *Staphylococci* dibagi menjadi dua kelompok, yaitu *Staphylococcus* koagulase positif dan *Staphylococcus* koagulase negatif berdasarkan pada kemampuannya untuk mengkoagulasi plasma kelinci.

Sebanyak 19 isolat bakteri yang ditanam pada *serum soft agar* yang mengandung serum kelinci memperlihatkan hasil 12 isolat (63,16%) pertumbuhan koloninya berbentuk kompak sedangkan 7 isolat (36,84%) koloninya berbentuk difus. Sebagian besar (75%) *Staphylococcus aureus* koagulase positif tumbuh sebagai koloni kompak, dan 66,7% *S. aureus* koagulase negatif tumbuh sebagai koloni difus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Finkelstein dan Sulkin (1958) yang menyatakan bahwa *Staphylococci* koagulase positif

tumbuh sebagai koloni kompak, sedangkan *Staphylococci* koagulase negatif tumbuh sebagai koloni difus. Teknik *serum soft agar* didasarkan atas kemampuan protein-A untuk berikatan dengan reseptor Fc imunoglobulin G berbagai spesies mamalia. Bakteri *S. aureus* yang mengandung protein-A pada *serum soft agar* dengan serum normal kelinci koloninya kompak. Koloni yang tampak tersebut karena hambatan pertumbuhan *S. aureus* oleh serum normal kelinci akibat ikatan protein-A dengan bagian Fc imunoglobulin G. Sementara itu, koloni *S. aureus* pada SSA dengan serum normal kelinci berbentuk difus mengindikasikan dua kemungkinan, yaitu *S. aureus* tidak memiliki protein-A atau memiliki protein-A namun tertutup kapsul bakteri (Djannatun, 2002). Bentuk koloni difus diduga berkaitan dengan kemampuan invasi bakteri pada jaringan tubuh inang. Bakteri yang berkapsul dapat melekat kuat pada sel inang dan mampu menahan penyingkiran bakteri oleh sel radang polimorfonuklear (PMN) (Forsum *et al.*, 1972).

Uji fagositosis dilakukan untuk mengetahui hubungan aktivitas fagositosis *S. aureus* berdasarkan keberadaan protein-A yang dapat diamati dari morfologi koloni pada media *serum soft agar*. Pada uji fagositosis digunakan leukosit polimorfonuklear kelinci dengan perlakuan suspensi *S. aureus* secara *in vitro*. Hasil uji fagositosis yang menunjukkan jumlah *S. aureus* yang difagosit oleh leukosit polimorfonuklear kelinci dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji fagositosis leukosit polimorfonuklear kelinci terhadap bakteri *S. aureus*

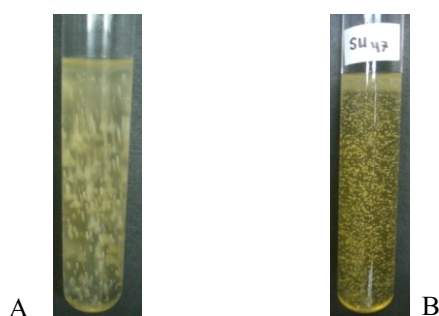
Kode	Asal Isolat	Koagulase	Morfologi Koloni pada SSA	Kemungkinan Keberadaan Protein-A	Jumlah Bakteri (bakteri/sel)	Rata-rata Jumlah bakteri/sel
P5	Jawa Barat	-	Difus	-	3,66	3,85
I2	Jawa Barat	-	Difus	-	2,4	
SU16	Jawa Tengah	+	Difus	-	5,5	2,99
SU39	Jawa Tengah	+	Difus	-	3,85	
I4	Jawa Barat	+	Kompak	+	3,57	
Jaed2	Jawa Barat	+	Kompak	+	2,35	
SU10	Jawa Tengah	+	Kompak	+	3,32	
Y5	Jawa Tengah	+	Kompak	+	2,71	

Keterangan : SSA : *serum soft agar*

Berdasarkan Tabel 2, dapat diamati bahwa bakteri yang memiliki protein-A dan tidak memiliki kapsul atau morfologi koloninya berbentuk kompak pada media SSA rata-rata jumlah bakteri yang berhasil difagosit oleh leukosit polimorfonuklear lebih sedikit daripada bakteri yang tidak memiliki protein-A atau memiliki protein-A tetapi tertutup kapsul yang morfologi koloni pada media SSA berbentuk difus. Hal ini menandakan bahwa *S. aureus* yang memiliki protein-A mempunyai pertahanan yang lebih kuat terhadap proses fagositosis dibandingkan dengan *S. aureus* yang tidak memiliki protein-A. Protein-A berperan sebagai faktor virulensi bakteri *Staphylococcus* yaitu dengan mengikat Fc molekul imunoglobulin

(IgG). Ikatan Fc-IgG dengan protein ini dapat mengakibatkan tidak terjadinya opsonisasi dan proses fagositosis dihambat oleh antifagosit, sehingga terhambatnya proses fagositosis memberi kesempatan pada bakteri untuk berbiak dan menginfeksi inang (Carlton dan Charles, 1993; Suarsana, 2005).

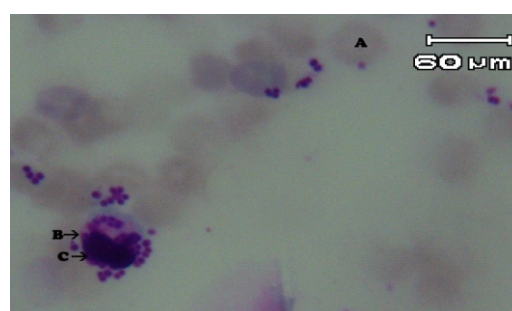
Berdasarkan sifat hemolisis, koagulase dan keberadaan protein-A, dapat diketahui bahwa isolat *S. aureus* asal Jawa Tengah lebih virulen dibandingkan *S. aureus* asal Jawa Barat karena isolat asal Jawa Tengah mempunyai kemampuan adesi dan kolonisasi serta pertahanan terhadap proses fagositosis yang lebih baik.



Gambar 1. Hasil pengujian *serum soft agar* untuk isolat *Staphylococcus aureus*

A: Koloni *S. aureus* isolat P₅ bersifat difus

B: Koloni *S. aureus* isolat SU₄₇ bersifat kompak



Gambar 2. *Staphylococcus aureus* isolat SU₂₄ difagositosis oleh leukosit polimorfonuklear

A: Eritrosit

B: Bakteri yang berhasil difagosit oleh PMN

C: Leukosit PMN

Kesimpulan

Bakteri *S. aureus* yang mempunyai mempunyai protein-A atau tumbuh kompak pada media SSA lebih patogen daripada *S. aureus* yang tidak memiliki protein-A atau mempunyai protein-A tetapi tertutup oleh kapsul atau tumbuh difus pada media SSA. Bakteri *S. aureus* isolat asal Jawa Tengah lebih virulen dibandingkan *S. aureus* isolat asal Jawa Barat ditinjau dari zona hemolisis, koagulase, dan keberadaan protein-A pada media SSA.

Daftar Pustaka

- Boyd, R. I. and Morr, J. J. (1984). *Medical Microbiology*. Little, Brown and Company, Boston. Pp 34-37.
- Budiarto, Effendi, M. H. (2008). Perbandingan Ekspresi Protein A Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Coagulase Negative Staphylococci* (CNS) from Bovine Mastitis Milk. *Veterinaria Medika* 1(3): 87-92.
- Brückler, J., Schwarz, S., and Untermann, F. (1994). *Staphylokokken-Infektionen Und Enterotoxine Band. II/I. In: Blobel H, Schließer T (Eds.). Handbuch Der Bakteriellen Infektionen Bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.*
- Carter, G. R. and Wise, D.J. (2004). *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 6th Edition. Iowa State Press, Iowa. Pp 183-188.
- Carlton, L. G. and Charles, O.T. (1993). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 2nd edition. Iowa State University Press. Pp 21-28.
- Cunningham, R., Cockayre, A., and Humprey, H. (1996). Clinical and Molecular Aspect of the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bone and Joint Infention. *J. Med. Microbiol.* 44: 157-164.
- Djannatun, T. (2002). Metode Sederhana dan Praktis Pengujian Keberadaan Protein-A *Staphylococcus aureus* Isolat Asal Manusia dan Sapi Perah Serta Aplikasinya Dalam Pembuatan Perangkat Diagnostik. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fardiaz, S. (1993). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT Grafindo Persada, Jakarta.
- Finkelstein, R. A., and Sulkin, S. E. (1958). Characteristics of Coagulase Positive and Coagulase Negative *Staphylococci* in Serum-Soft Agar. *J.Bacteriol.* 75: 339-344.
- Fox, L. K and Melinda, S. C. (1996). Relationship Between Thickness, Chapping, and *Staphylococcus aureus* Colonization of Bovine Teat Tissue. *J.Dairy Res.* Pp. 369-375.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Jones, G.M. (1998). *Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection and Control*. Virginia Cooperative Extension, USA. Pp 1-2.
- Khusnan dan Salasia, S.I.O. (2006). Respon Neutrofil, Adesi pada Sel Epitel, Aglutinasi Eritrosit Terhadap *Staphylococcus aureus* : Kajian Hidrofobisitas *In Vitro*. *J. Sain Vet.* 24(1): 102-108.
- Morin, D.E. and Hurley, W.L. (2003). *Mastitis Lesson B*. University of Illinois, USA. P 308.
- Suarsana, I. N. (2005). Protein-A : II. Penggunaan dalam Diagnostik Laboratorium. *J. Vet.* 6 (1) : 28-33.
- Taloro, A. and Taloro, K. P. (2002). *Foundations in Microbiology*. McGraw Hill, Boston.
- Todar, K. (2005). *Todar's Online Textbook of Bacteriology. Staphylococcus*. University of Winconsin-Madison. Department of Bacteriology. . Diakses : 08 Mei 2012.
- Wibawan, I. W. T., Harlina, E., dan Damayanti, C. S. (2005). Preparasi Antiserum Terhadap Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* Serta Peranannya Sebagai Anti Adhesin dan Opsonin. *J. Vet. Vol.6*