

Identifikasi Fenotipik dan Genotipik *Staphylococcus aureus* Isolat Asal Susu Sapi Perah Mastitis Subklinis di Wilayah Pamulihan, Kabupaten Sumedang Jawa Barat

Phenotypic and Genotypic Identification of Staphylococcus aureus Isolate from Subclinical Mastitis of Dairy Cattle in Pamulihan Region, Sumedang Regency, West Java

Sarasati Windria^{1,2*}, Alifya Azzahra Cahyaningtyas², Adi Imam Cahyadi¹, Hesti Lina Wiraswati³, Julia Ramadhanti⁴

¹Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

²Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung Sumedang km. 21, Jatinangor, Hegarmanah, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia 45363

³Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Divisi Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

⁴Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Divisi Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

Telepon 022-7796373, 7795594, Fax. 022-7795595

*Email: sarasati.windria@unpad.ac.id

Naskah diterima: 6 Juli 2022, direvisi: 10 Juli 2023, disetujui: 10 Juli 2023

Abstract

Staphylococcus aureus was Gram positive coccus bacterium from the staphylococcaceae family as the main bacterium causing subclinical mastitis. The aim of this study was to phenotypic and genotypic identification of *Staphylococcus aureus* as a cause of subclinical mastitis in dairy cows. Phenotypic identification of *Staphylococcus aureus* was determined based on biochemical tests including Gram staining, mannitol salt agar (MSA), catalase, coagulase and DNase tests. Genotypic identification was determined based on detection of the presence of 23SrRNA, nuc and coa genes using specific primers for *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction (PCR). A total of 74 samples of cow's milk were collected from community farms in Tanjung Sari District, Sumedang Regency, West Java. Of the 74 milk samples collected, 53 samples or 71.62% identified subclinical mastitis based on positive test results ($+> 2$) California mastitis test (CMT). Of the 53 samples of subclinical mastitis milk identified phenotypically 28 isolates (52.83%) were positive as *S. aureus*. Based on the genotypic identification of 28 isolates, 28 isolates (100%) were positively detected for having the 23S rRNA gene, nuc and coa genes which indicated a specific species of *Staphylococcus aureus*

Keywords: Dairy cattle; PCR; *Staphylococcus aureus*; Subclinical Mastitis

Abstrak

Staphylococcus aureus adalah bakteri coccus Gram positif dari keluarga *staphylococcaceae* sebagai bakteri utama penyebab mastitis subklinis. Tujuan penelitian adalah untuk melakukan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara fenotipik dan genotipik sebagai penyebab mastitis subklinis pada sapi perah. Identifikasi fenotipik *Staphylococcus aureus* ditentukan berdasarkan uji biokimiawi meliputi pewarnaan Gram, mannitol salt agar (MSA), katalase, koagulase dan uji DNase. Identifikasi genotipik ditentukan berdasarkan deteksi keberadaan gen 23SrRNA, nuc dan coa menggunakan primer spesifik untuk *Staphylococcus aureus* dengan polymerase chain reaction (PCR). Total sebanyak 74 sampel susu sapi dikoleksi berasal dari peternakan rakyat, Kecamatan Pamulihan, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Dari 74 sampel susu yang dikoleksi sebanyak 53 sampel atau sebesar 71,62% teridentifikasi mastitis subklinis berdasarkan hasil uji positif ($+>2$) California mastitis test (CMT). Dari 53 sampel susu mastitis subklinis teridentifikasi secara fenotipik sebesar 28 isolat (52,83%) positif sebagai *S. aureus*. Berdasarkan identifikasi secara genotipik dari 28 isolat, terdapat 28 isolat (100%) positif terdeteksi memiliki gen 23S rRNA, gen *nuc* dan *coa* yang mengindikasikan sebagai spesies spesifik *Staphylococcus aureus*

Kata kunci: Mastitis subklinis; Molekuler, PCR; Sapi Perah; *Staphylococcus aureus*

Pendahuluan

Kabupaten Sumedang merupakan salah satu kabupaten di Jawa Barat. Kabupaten Sumedang mempunyai luas wilayah sebesar 155.871,98 ha yang terdiri dari 26 kecamatan. Kondisi wilayah Kabupaten Sumedang bervariasi dari mulai dataran hingga perbukitan (45 – 855 mdp) dengan suhu tertinggi pada tahun 2020 adalah 37 derajat celcius. Sumedang adalah salah satu daerah penghasil susu sapi di Jawa Barat, selain Lembang dan Pengalengan. Kecamatan Pamulihan merupakan wilayah dengan populasi sapi tertinggi di kabupaten Sumedang. Populasi sapi perah pada tahun 2020 tersebar pada 11 kecamatan. Populasi sapi perah tertinggi berturut-turut adalah Kecamatan Pamulihan, Tanjungsari, Cimanggung, Sumedang Utara, Jatinangor, Sukasari, Rancakalong, Cisitua, Tanjungkerta, Sumedang Selatan, dan Situraja. Produksi susu sapi perah pada tahun 2017 adalah sebanyak 10.113,73 ton. Sedangkan pada tahun 2020, produksi susu sapi perah di Kabupaten Sumedang hanya sebanyak 9.219,29 ton. Dari data tersebut, dapat dikatakan bahwa produksi susu sapi perah di Kabupaten Sumedang mengalami penurunan dari tahun ke tahun (BPS Kabupaten Sumedang, 2021).

Mastitis merupakan salah satu penyebab penurunan kualitas dan kuantitas susu sapi. Mastitis merupakan respon inflamasi jaringan ambing pada kelenjar susu yang disebabkan karena trauma fisik atau infeksi mikroorganisme (Cheng & Han, 2020). Manifestasi penyakit mastitis pada sapi perah dibedakan menjadi dua macam yaitu mastitis klinis dan subklinis (Iraguha et al., 2017). Kejadian mastitis di Indonesia sangat tinggi yaitu sekitar 97-98% merupakan mastitis subklinis, sedangkan 2-3% merupakan kasus mastitis klinis yang terdeteksi (Nisa dkk., 2019). Prevalensi mastitis subklinis di Jawa Barat pada tahun 2016 adalah sebesar 67,5% (Susanty, 2018).

Mastitis subklinis dianggap sebagai penyakit paling umum yang menyebabkan kerugian ekonomi pada industri susu (Gomes & Henriques, 2016). Meskipun susu tampak normal, sapi dengan mastitis subklinis menghasilkan lebih sedikit susu dengan kualitas buruk termasuk umur simpan produk susu yang lebih pendek dan peningkatan risiko kebersihan

susu karena mengandung berbagai organisme patogen (Alhussien & Dang, 2020).

Staphylococcus aureus adalah agen penyebab umum mastitis pada sapi yang banyak ditemukan pada peternakan sapi perah di seluruh dunia (Hoque et al., 2018). *S. aureus* termasuk bakteri yang berbahaya, karena patogenitas organisme ini memiliki proses yang kompleks dan melibatkan berbagai faktor virulensi yang berlangsung ketika proses infeksi terjadi pada jaringan (Cotar et al., 2010). *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan enterotoksin yang akan terbawa hingga ke produk susu sehingga dapat menyebabkan keracunan pada konsumen. Enterotoksin tersebut bersifat termotabil karena memiliki gen *nuc* yang membuat toksin tersebut dapat bertahan pada suhu tinggi (Sutejo et al., 2017). *Staphylococcus aureus* juga merupakan spesies yang paling invasif dan paling berbeda dari spesies *Staphylococcus* lainnya karena memiliki enzim koagulase yang dikodekan oleh gen *coa* (Husna, 2018).

Metode yang mudah diaplikasikan dalam mengidentifikasi keberadaan *Staphylococcus aureus* dari susu sapi segar yang mengalami mastitis subklinis diperlukan untuk mengontrol penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini (Aziz dkk., 2020). Identifikasi secara genotipik berdasarkan susunan nukleotida berguna untuk lebih memastikan dalam penentuan spesies spesifik bakteri. Deteksi gen *nuc* dan gen *coa* sebagai gen penanda spesifik dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode *gold standard* untuk mengkonfirmasi isolat *Staphylococcus aureus* (Koupahi et al., 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan *S. aureus* secara fenotipik serta genotipik pada sampel susu sapi perah penyebab mastitis subklinis di wilayah Kabupaten Sumedang.

Materi dan Metode

Koleksi sampel dan Identifikasi Fenotipik *S. aureus*

Penelitian ini menggunakan 74 sampel susu sapi perah yang berasal dari peternakan rakyat, Kecamatan Pamulihan, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Sampel berasal dari peternakan HAT 20 sampel, peternakan milik PAD 20 sampel dan Peternakan KIP 34 sampel. Sampel

susu dikoleksi secara aseptik, sebanyak 10 ml puting susu sapi dan ditampung dalam tabung konikal steril, tiap tabung diberikan etiket/label. Uji Californian Mastitis Test (CMT) dilakukan untuk menentukan susu mastitis subklinis (Shearer dan Harris, 2003; Setiawan *et al.*, 2011). Susu mastitis subklinis dimasukkan dalam tabung dan disimpan dalam box pendingin dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Isolasi dan identifikasi secara fenotipik melalui kultur pada media *Blood Agar Plate* (BAP). Sampel pada penelitian ini dikultur pada media BAP, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* akan terlihat bundar, halus, menonjol, berkilau, berwarna abu-abu sampai kuning emas tua, serta menghasilkan zona hemolisis. Koloni yang telah diperbanyak kemudian dilakukan pengujian lebih lanjut dengan penanaman pada media selektif-diferensial *Mannitol Salt Agar* (MSA), pewarnaan Gram, uji katalase, uji DNase, dan uji koagulase (Harrigan, 1998; Salasia *et al.*, 2004). Isolat *S. aureus* positif 23S rRNA dengan kode American Type Culture Cell (ATCC) 29213 milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran digunakan sebagai kontrol positif.

Identifikasi Molekuler *S. aureus*

Ekstraksi DNA

Molekul DNA dari isolat *Staphylococcus aureus* diekstraksi dan purifikasi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Blood/Cultured Cell* GB300 (Geneaid, Taiwan) sesuai prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik, dengan modifikasi prosedur pada tahap preparasi sampel. Sebanyak 6 – 8 koloni terpisah dari media *Blood Agar Plate* (BAP), dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml steril yang telah berisi 160µl *lysis buffer*; kemudian ditambahkan 20µl *Lysozyme*. Isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. 200µl GB Buffer ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml dan dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 60° selama minimal 10 menit. Selama inkubasi, tabung dibalikkan setiap 3 menit. Ditambahkan 200µl *absolute ethanol* kemudian dihomogenkan.

Campuran tersebut dipindahkan ke dalam *spin column*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 xg selama 2 menit. *Collection tube* 2 ml yang berada di bawah *spin column* dibuang dan diganti dengan *tube* yang baru. 400µl W1 Buffer ditambahkan ke dalam GD *column* lalu disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan yang sama, kemudian cairan yang tertampung dibuang. 600µl *wash buffer* yang sudah ditambahkan dengan etanol ditambahkan ke dalam GD *column*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit, lalu cairan dibuang kembali dan disentrifuge selama 3 menit untuk mengeringkan *column matrix*. *Collection tube* dibuang dan diganti dengan mikrosentrifuge steril. GD *column* yang sudah kering dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang steril. 50µl *Elution buffer* yang telah dipanaskan sebelumnya ditambahkan ke dalam *column matrix*. Diamkan selama 3 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 xg selama 30 detik. Cairan yang mengandung DNA yang tertampung pada tabung mikrosentrifuge (*elution product*), disimpan pada -4°C untuk digunakan sebagai template PCR.

Amplifikasi Gen Spesifik

Amplifikasi gen penyandi 23SrRNA, gen *nuc*, dan gen *coa* dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik berdasar referensi Salasia *et al.*, (2011). Desain Primer Oligonukleotida dan Program PCR untuk mengamplifikasi Gen 23S rRNA, Gen *nuc*, dan Gen *coa* dari *Staphylococcus aureus* tersedia pada Tabel 1. Komposisi 25µl campuran pereaksi PCR terdiri atas 2µl *forward primer* (IDT, United States) dan 2µl *reverse primer* (IDT, United States) dengan masing-masing 10 pmol/µM primer, 12,5µl *DreamTaq Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific, China), 5,5µl *nuclease-free water*, serta 3µl DNA *template*. Produk PCR dielektroforesis pada gel *agarose* 1,5% (Thermo Scientific, China) menggunakan 0.5xTBE Buffer. Amplikon yang dihasilkan divisualisasikan menggunakan pewarnaan *FloroSafe* (1st Base, Singapura). Hasil PCR divisualisasikan dengan *UV transluminator*, dan dibandingkan dengan DNA *ladder* 100 bp (Geneaid, Taiwan) sebagai penanda ukuran fragmen DNA.

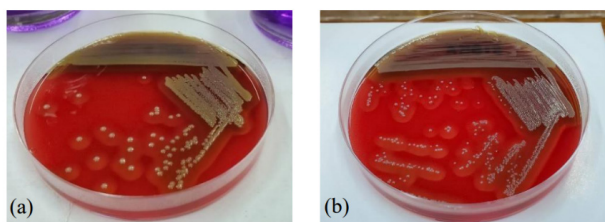
Tabel 1. Desain Primer Oligonukleotida dan Program PCR untuk mengamplifikasi Gen 23S rRNA, Gen *nuc*, dan Gen *coa* dari *Staphylococcus aureus*

Gen target	Gen 23s rRNA	Gen <i>nuc</i>	Gen <i>coa</i>
Primer forward	5' ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC 3'	5' GCG ATT GAT GGTGAT ACG GTT 3'	5' ATA GAG ATG CTGGTA CAG G 3'
Primer reverse	3' AGC TCA GCC TTAACG AGT AC 5'	3' ACG CAA GCC TTGACG AAC TAAAGC 5'	3' GCT TCC GAT TGTTTCG ATG C 5'
Siklus	37	37	30
Denaturasi awal	94°C, 300 detik	94°C, 300 detik	94°C, 300 detik
Denaturasi	94°C, 120 detik	94°C, 60 detik	94°C, 60 detik
Annealing	64°C, 60 detik	55°C, 45 detik	58°C, 60 detik

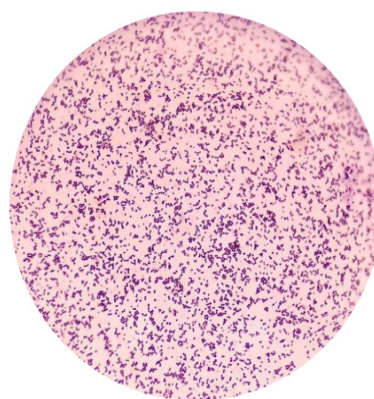
Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan dari 74 sampel susu yang dikoleksi sebanyak 53 sampel atau sebesar 71,62% teridentifikasi mastitis subklinis berdasarkan hasil uji positif (>2) California mastitis test (CMT). Dari 53 sampel susu mastitis subklinis teridentifikasi secara fenotipik sebesar 28 isolat (52,83%) positif sebagai *S. aureus*. Hasil uji fenotipik *S. aureus* secara biokimia ditunjukkan dengan koloni berbentuk bulat, bewarna putih hingga kuning keemasan pada media Blood Agar Plater (BAP) (Gambar 1.); Gram positif tampak koloni sel berbentuk bulat (*coccus*), bergerombol seperti anggur dan bewarna biru keunguan (Gambar 2.). Hasil skrining dengan menggunakan media selektif *Mannitol salt agar* (MSA), diketahui bahwa isolat *Staphylococcus* mampu memfermentasi *mannitol* dengan mengubah warna merah muda menjadi bewarna kuning, katalase positif (+) (Gambar 3.), koagulase positif (+) (Gambar 4.) serta DNAase positif (+) (Gambar 5.) . Hasil identifikasi secara fenotipik keseluruhan dari disajikan pada Tabel 2.

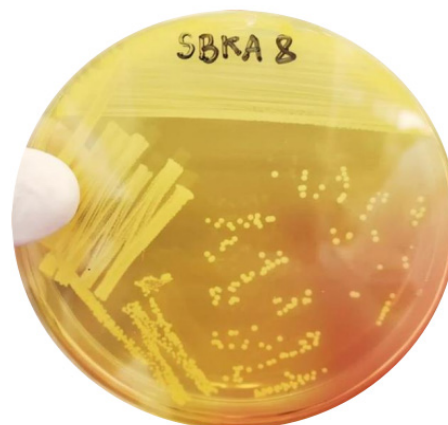
Isolat dikultur pada media agar darah sebagai media *enrichment* atau media pengaya yang mengandung 5% darah domba. Koloni



Gambar 1. (a) koloni kuning emas tua; (b) koloni abu-abu. Koloni *Staphylococcus aureus* pada media BAP Agar Plate (BAP) berbentuk bundar, halus, dan menonjol.



Gambar 2. Pewarnaan Gram memperlihatkan bakteri Gram positif berbentuk coccus



Gambar 3. Kultur *Staphylococcus aureus* pada media MSA



Gambar 4. Uji Koagulase



Gambar 5. Uji DNase hasil positif koloni *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus yang tumbuh pada media agar darah akan terlihat bundar, halus, menonjol, berkilau, serta berwarna abu-abu sampai kuning emas tua. Selain menjadi media *enrichment*, *Blood Agar Plate* (BAP) dapat menjadi penentu untuk membedakan karakteristik bakteri berdasarkan kemampuan hemolisis *Staphylococcus aureus* terhadap sel darah merah (Moraveji *et al.*, 2014). Sejumlah 5 isolat (17,86%) menghasilkan α -hemolisin yaitu membentuk zona gelap agak bening di sekitar koloni dan 23 isolat (10,14%) lainnya menghasilkan β -hemolisin akan membentuk zona bening di sekitar koloni sehingga terlihat jelas dan transparan. Zona hemolisis di sekitar koloni bakteri terbentuk karena bakteri patogen menghasilkan toksin hemolisin yang dapat merusak atau melisis membran sitoplasma dalam sel darah merah (Nawar *et al.*, 2021).

Hasil kultur 28 isolat pada media MSA menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri yang mengubah warna merah media menjadi warna kuning karena terjadi fermentasi mannitol. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk memfermentasikan mannitol yang akan menghasilkan produk berupa asam organik sehingga dapat mengubah pH pada media MSA (Prasetyo & Kusumaningrum, 2014). Hasil pewarnaan gram sebanyak 28 isolat menunjukkan hasil positif pewarnaan Gram. *Staphylococcus aureus* akan terlihat koloni berbentuk coccus, bergerombol, dan berwarna ungu. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri Gram positif. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri dengan melihat morfologi serta reaksi Gram

bakteri agar dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif (Sizar & Unakal, 2022). Uji katalase bertujuan untuk membedakan antara bakteri genus *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* (Karimela dkk., 2017). Katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung gas (O_2) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus* (Toelle & Lenda, 2014). Uji DNase digunakan untuk melihat aktivitas deoksiribonuklease dan koagulase positif pada bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni yang menandakan terdapat aktivitas DNase yang menghidrolisis deoksiribonuklease. Bakteri yang mempunyai aktivitas DNase positif adalah *Staphylococcus aureus* (Umarudin & Surahmida, 2019). Hasil uji yang menunjukkan reaksi negatif bisa saja merupakan hasil negatif palsu. Pada penelitian yang dilakukan oleh Pumipuntu *et al.* (2017), hasil uji DNase menunjukkan nilai spesifisitas yang lebih tinggi (41,84%) jika dibandingkan dengan pengujian pada media diferensial MSA (31,37%), tetapi uji DNase menunjukkan hasil negatif palsu (26,79%), sedangkan dari MSA tidak ada hasil negatif palsu. Uji koagulase merupakan suatu pemeriksaan bakteri untuk diferensiasi *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya (Jiwintarum dkk., 2015). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri *Coagulase positive Staphylococci* (CPS) sehingga akan menghasilkan reaksi positif pada uji koagulase yang ditunjukkan dengan adanya gumpalan seperti gel dalam tabung (Hayati dkk., 2019). Hasil pengujian secara fenotipik sebanyak 28 isolat menunjukkan bahwa bakteri gram positif (100%), katalase positif (100%), koagulase positif (100%), DNase positif (76%), dan DNase negatif (24%).

Sebanyak 28 isolat yang teridentifikasi secara fenotipik mengarah pada *Staphylococcus aureus* dilanjutkan dengan identifikasi secara molekuler dengan mengamplifikasi terhadap gen penyandi spesifik. Meskipun secara keseluruhan hasil uji identifikasi fenotipik mengarah pada *Staphylococcus aureus*, perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut secara molekuler dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Peneguhan identitas *Staphylococcus aureus* dilakukan karena adanya variasi pada hasil uji fenotipik

Tabel 2. Komparasi hasil uji fenotipik dan genotipik terhadap isolat *Staphylococcus aureus* isolat asal susu sapi perah mastitis subklinis di Wilayah Kabupaten Sumedang

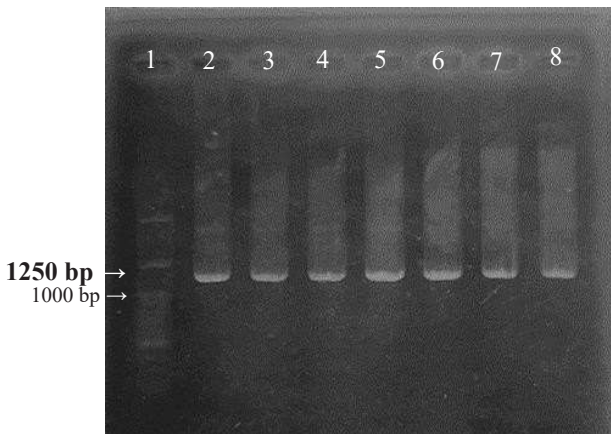
No.	Kode Isolat	Uji Fenotipik					Uji Genotipik				
		Zona Hemolisa	MSA	Pewarnaan Gram	Uji Katalase	Uji DNase	Uji Koagulase	23S rRNA ¹	<i>nuc</i> ²	<i>coa</i> ³	
1	7.21346	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
2	9.21348	α	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(800 bp)
3	10.21349	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
4	11.21350	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
5	14.21353	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(800 bp)
6	16.21355	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
7	3 BAY	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
8	2 BKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
9	10 BKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
10	21 BKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
11	S1 BKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(760 bp)
12	S2 BKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
13	S2 BKI	α	+	coccus +	+	-	+	+	+	+	(800 bp)
14	7 DKA	β	+	coccus +	+	-	+	+	+	+	(700 bp)
15	20 DKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(800 bp)
16	21 DKA	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
17	14 DKI	α	+	coccus +	+	-	+	+	+	+	(760 bp)
18	16 DKI	α	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
19	S1 DKI	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
20	S3 DKI2	α	+	coccus +	+	-	+	+	+	+	(800 bp)
21	6 DAD	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
22	4 DAD1	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
23	1 DID	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(680 bp)
24	4 DID	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(760 bp)
25	8 DID	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
26	4 DAM2	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(700 bp)
27	1 DIM1	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)
28	4 DIM1	β	+	coccus +	+	+	+	+	+	+	(600 bp)

¹Gen 23S rRNA: 1250 bp (Straub *et al.*, 1999); ²*nuc*: 279 bp (Brakstad *et al.*, 1992); ³*coa*: polymorphism (Hookey *et al.*, 1998)

yang mengarah pada spesies *Staphylococcus* lainnya. Identifikasi untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari *Staphylococcus spp.* harus ditentukan dengan identifikasi genotipe, menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi gen 23S rRNA, gen *nuc*, dan gen *coa* (Windria *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, 38 (100%) isolat positif mengamplifikasi gen 23S rRNA dengan desain primer (Straub *et al.*, 1999) menghasilkan amplicon sebesar 1250 bp, gen *nuc* dengan desain primer (Brakstad *et al.*, 1992) menghasilkan amplicon sebesar 279 bp, dan gen *coa* dengan desain primer (Hookey *et al.*, 1998) menghasilkan amplicon yang bervariasi sebesar 600 bp, 680 bp, 700 bp, 760 bp, 800 bp, dan 840

bp. Produk PCR dielektroforesis menggunakan 1.5% gel agarose, kemudian divisualisasikan pada *UV transluminator* (Gambar 1, 2, dan 3).

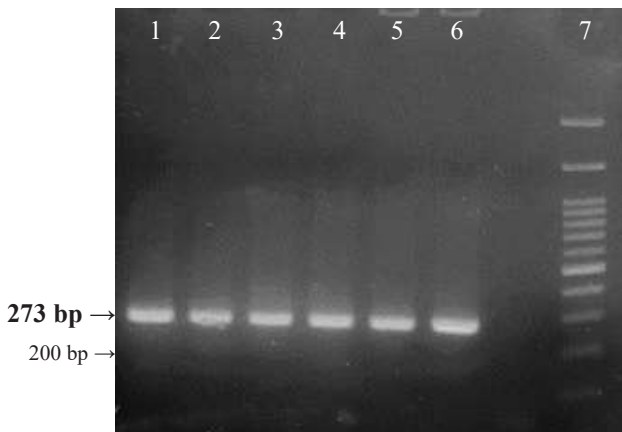
Berdasarkan hasil PCR, 28 sampel memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen 23S rRNA dengan amplicon yang berbeda sebesar 1250 bp (Gambar 1) menunjukkan bahwa sampel terdeteksi sebagai *Staphylococcus aureus*. Desain primer Straub *et al.* (1999) digunakan pada penelitian Windria *et al.* (2016) dan Artdita, dkk. (2021) untuk mendeteksi keberadaan gen 23S rRNA *Staphylococcus aureus* berdasarkan hasil sekuensing. Gen 23S rRNA merupakan bagian penting pada proses sintesis protein. Hampir semua bakteri memiliki



Gambar 1. Elektroforesis gel agarose 1,5% (Thermo Scientific, China) hasil PCR sampel DNA *Staphylococcus aureus* terhadap amplifikasi gen 23S rRNA; sumur 1: marker DNA 100 bp; sumur 2 – 7: sampel

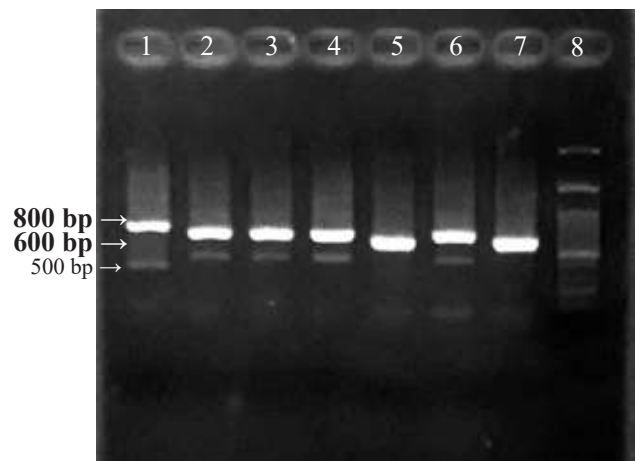
urutan basa nukleotida yang identik pada gen 23S rRNA, sehingga gen ini dapat digunakan sebagai target spesifik untuk mengidentifikasi genus dan spesies (Aziz dkk., 2020). Keunggulan gen 23S rRNA sebagai gen target jika dibandingkan dengan gen 16S rRNA dalam mengidentifikasi bakteri adalah karena gen 23S rRNA mengandung urutan lebih panjang dan bervariasi sehingga memiliki resolusi filogenetika yang lebih baik (Prasetyo & Kusumaningrum, 2014).

Berdasarkan hasil PCR, 28 sampel memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *nuc* dengan amplicon sebesar 279 bp (Gambar 2), menunjukkan bahwa sampel terdeteksi sebagai *Staphylococcus aureus*. Desain primer Brakstad *et al.* (1992) digunakan pada penelitian Khusnan, dkk. (2016) untuk



Gambar 2. Elektroforesis gel agarose 1,5% (Thermo Scientific, China) hasil PCR sampel DNA *Staphylococcus aureus* terhadap amplifikasi gen *nuc*; sumur 7: marker DNA 100 bp; sumur 1 – 6: sampel

mendeteksi keberadaan gen *nuc* untuk mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* dari sampel broiler dengan hasil 100% sampel positif mengamplifikasi gen *nuc*. Gen *nuc* mengkodekan enzim *thermonuclease* dimana enzim tersebut berperan utama dalam aktivitas *thermonuclease* pada bakteri *Staphylococcus aureus* (Hu *et al.*, 2012). Nuklease adalah enzim fosfodiesterase dengan kemampuan endonukleolitik dan eksonukleolitik dan dapat memotong DNA atau RNA. Enzim ini tersusun atas rantai tunggal polipeptida, berbentuk kompak globuler, berada dalam permukaan sel, pada permukaan sel atau dekat permukaan sel *Staphylococcus aureus* (Karimela dkk., 2017). Nuklease ini bersifat termostabil atau tahan pada suhu tinggi. Enzim ini berperan penting karena kontaminasi *Staphylococcus aureus* masih dapat berada dalam produk susu meskipun sudah diolah dengan proses pemanasan (Sutejo *et al.*, 2017).



Gambar 3. Elektroforesis gel agarose 1,5% (Thermo Scientific, China) hasil PCR sampel DNA *Staphylococcus aureus* terhadap amplifikasi gen *coa*; sumur 8: marker DNA 100 bp; sumur 1 – 7: sampel

Berdasarkan hasil PCR, 28 sampel memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *coa* dengan amplicon yang berbeda sebesar 600 – 800 bp (Gambar 3) menunjukkan bahwa sampel terdeteksi sebagai *Staphylococcus aureus coagulase positive*. Produk PCR yang dihasilkan bervariasi dengan ukuran fragmen DNA yang berbeda. Perbedaan produk amplifikasi mencerminkan adanya variasi ukuran panjangnya gen *coa* pada strain *Staphylococcus aureus* (Effendi *et al.*, 2019). Pada studi yang dilakukan oleh Effendi *et al.*, (2017) dan Javid *et al.*, (2018) dengan menggunakan desain

primer (Hookey *et al.*, 1998) juga menunjukkan bahwa ada jenis gen *coa* yang berbeda. Gen *coa* adalah suatu penanda adanya enzim koagulase yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Koagulase adalah penentu karakteristik fenotipik yang penting dan juga berperan sebagai faktor virulensi dari *Staphylococcus aureus* (Abbas *et al.*, 2014). Kemampuannya untuk menghasilkan *coa* yang berperan dalam membekukan plasma adalah sifat yang menentukan dari *Staphylococcus aureus* dan membedakan dari spesies *Staphylococcus* lainnya (Foster *et al.*, 2015). Koagulase juga berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap fagositosis inang. Koagulase akan membentuk fibrin pada permukaan *Staphylococcus aureus*, dimana hal tersebut menjadikan bakteri ini resisten terhadap fagositosis (Wang *et al.*, 2016).

Kesimpulan

Berdasarkan identifikasi, karakterisasi fenotipik dan genotipik *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri penyebab mastitis pada Susu Sapi Perah Mastitis Subklinis dapat disimpulkan sebagai berikut dari total 74 sampel susu sapi perah yang dikoleksi dari wilayah Pamulihan, berdasarkan uji *california mastitis test* (CMT) berhasil diidentifikasi sebanyak 53 sampel atau sebesar 71,62% teridentifikasi mastitis subklinis. Dari 53 sampel positif uji CMT berhasil diidentifikasi secara fenotipik sebanyak 28 isolat (52,83%) positif teridentifikasi *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan identifikasi molekular terhadap gen 23SrRNA, gen *nuc* dan gen *coa* melalui PCR berhasil teridentifikasi 28 isolat positif sebagai *Staphylococcus aureus*.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian hasil penelitian yang dibiayai dengan dana Hibah Internal Universitas Padjadjaran Nomor: 4851/UN6.C/LT/2018. Penulis mengucapkan terima kasih kepada KSU Tandang Sari, Tanjung Sari, Kabupaten Sumedang serta semua pihak yang telah membantu hingga selesainya penelitian ini.

Daftar Pustaka

Abbas, B. A., Khudor, M. H. & Hanoon, B. M. (2014). Isolation and identification of

Staphylococcus aureus from bovine and the detection of its coagulase gene (*coa*) using polymerase chain reaction (PCR). *Sci. Res. Essays*, 9(20): 864-868.

- Alhussien, M.N., & Dang, A.K. (2020). Sensitive and rapid lateral-flow assay for early detection of subclinical mammary infection in dairy cows. *Sci Rep* 10, 11161. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68174-0>
- Aziz, F., Lestari, F. B., Nuraida, S. 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*. Vol. 38 No. 2, 168-174.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of clinical microbiology*, 30(7), 1654–1660. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.7.1654-1660.1992>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Cotar, A. I., Chifiriuc, M. C., Dinu, S., Bucur, M., Iordache, C., Banu, O., Dracea, O., Larion, C., & Lazar, V. (2010). Screening of molecular virulence markers in *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections. *Int. J. Mol. Sci.* 11(12), 5273–5291.
- Effendi, M. H. & Harijani, N. (2017). Cases of Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from raw milk in East Java, Indonesia. *Glob. Vet.*, 19(1): 500-503.
- Effendi, M. H., Hisyam, M. A. M., Hastutiek, P., & Tyasningsih, W. (2019). Detection of coagulase gene in *Staphylococcus aureus*

- from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. *Veterinary World*, 12(1), 68-71. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.68-71>
- Errata. (2012). Catalase-negative *Staphylococcus aureus* isolated from a diabetic foot ulcer. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(2), 101.
- Foster, T.J. and Geoghegan, J.A. (2015). Chapter 37: *Staphylococcus aureus*. In: Tang, Y.W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. and Schwartzman, J., editors. *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. *Academic Press, Boston*. p655-674.
- Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>.
- Harrigan, W.F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd Edn. *Gulf Professional Publishing, San Diego*, 532.
- Hayati, L. N., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Chusniati, S., Yunita, M. N., & Wibawati, P. A. (2019). Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* pada Susu Kambing Peranakan Etawah Penderita Mastitis Subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*, 2(2), 76-82. DOI: 10.20473/jmv.vol2.iss2.2019.76-82
- Hookey, J. V., Richardson, J. F., & Cookson, B. D. (1998). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 1083–1089. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.1083-1089.1998>
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International journal of veterinary science and medicine*, 6(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Husna, C. A. (2018). Peranan Protein Adhesi Matriks Ekstraselular dalam Patogenitas Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Averrous* Vol. 4 No. 2.
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., Mushonga, B., Kandiwa, E., & Mpatswenumugabo, J. P. (2017). Comparison of Cow-side Diagnostic Tests for Subclinical Mastitis of Dairy Cows in Musanze district, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1), 1–6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1464>
- Javid, F., Taku, A., Bhat, M. A., Badroo, G. A., Mudasir, M., & Sofi, T. A. (2018). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Veterinary world*, 11(4), 423–430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.423-430>
- Jiwintarum, Y., Srigede, L., & Rahmawati, A. (2015). Perbedaan Hasil Uji Koagulase Menggunakan Plasma Sitrat Manusia 3,8%, Plasma Sitrat Domba 3,8%, dan Plasma Sitrat Kelinci 3,8% pada Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kesehatan Prima*, Vol. 9 No.2, 1559-1569.
- Karimela, E. J., Ijong, F. G., & Dien, H. A. (2017). Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari ikan asap pinekuhe hasil olahan tradisional Kabupaten Sangihe. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(1): 188-198.
- Kou X, Cai H, Huang S, Ni Y, Luo B, Qian H, Ji H, & Wang X. (2021). Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China. *Front. Microbiol.* 12: 705947. doi: 10.3389/fmicb.2021.705947
- Koupahi, H., Honarmand Jahromy, S., & Rahbar, M. (2016). Evaluation of Different Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Iranian journal of pathology*, 11(4), 370–376.
- Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., & Khoshbakht, R. (2014). Characterization

- of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 326–330.
- Nawar, S., Rashid, M., Ahmed, A., Hossain, M., & Afzal, A. (2021). A Study of Prevalence and Pathogenic Activity of Bacteria in the Air of Dhaka City and Their Antimicrobial Resistance Pattern. *American Journal of Molecular Biology*, 11, 51-62. doi: 10.4236/ajmb.2021.112005.
- Nisa, H. C., Purnomo, B. S., Damayanti, T. L., Hariadi, M., Sidik, R., & Harijani, N. (2019). Analisis Faktor yang Mempengaruhi Kejadian Mastitis Subklinik dan Klinik pada Sapi Perah. *Ovozoa*, Vol. 8 No. 1, 66-70. ISSN: 2302-6464.
- Prasetyo, B. dan Kusumaningrum, E. N. (2014). Deteksi Gen *tst* Isolat *Staphylococcus aureus* melalui Amplifikasi 23S rRNA Asal Susu Kambing dan Sapi Perah. *Jurnal Kedokteran Hewan*. Vol. 8 No. 1. 76 – 79.
- Pumipuntu, N., Kulpeanprasit, S., Santajit, S., Tunyong, W., Kong-Ngoen, T., Hinthong, W., & Indrawattana, N. (2017). Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Veterinary world*, 10(7), 721–726.
- Salasia, S.I.O., Khusnan, Z., Lammler, 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. *Journal of Veterinary Science* 5(2), 103-109.
- Setiawan, J., Maheswari, R.R.A., dan Purwanto, B.P. 2013. Sifat Fisik dan Kimia, Jumlah Sel Somatik dan Kualitas Mikrobiologis Susu Kambing Peranakan Ettawa. *ACTA veterinaria indonesiana-indonesian veterinary journal* 1(1), 32-43.
- Shearer J.K and Harris Jr.B. 2003. Mastitis in dairy goats. IFAS Extension. University of Florida. USA.
- Sizar O & Unakal C. G. (2022). Gram Positive Bacteria. [Updated 2022 Feb 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>
- Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W. P. (1999). A 23S rDNA-Targeted Polymerase Chain Reaction- Based System for Detection of *Staphylococcus aureus* in Meat Starter Cultures and Dairy Products. *J. Food Prot.* 62 (10):1150–1156
- Susanty, H. (2018). *Evaluasi Penerapan Aspek Teknis dan Sebaran Spasial Produksi Susu dan Prevalensi Mastitis Subklinik Sapi Perah Rakyat di Jawa Barat* (Doctoral dissertation, IPB (Bogor Agricultural University)).
- Sutejo, S. V. H., Amarantini, C., & Budiarmo, T. Y. (2017). Molecular Detection of *Staphylococcus aureus* Resistant to Temperature in Milk and Its Products. 8th *International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC 2017)*. AIP Conf. Proc. 1908, 050007-1–050007-6; <https://doi.org/10.1063/1.5012731>
- Toelle, N. N. dan Lenda, V. (2014). Identifikasi dan Karakteristik *Staphylococcus Sp.* dan *Streptococcus Sp.* dari Infeksi Ovarium Pada Ayam Petelur Komersial. *Jurnal Ilmu Ternak*, Vol. 1, No. 7, 32 - 37.
- Wang, D., Zhang, L., Zhou, X., He, Y., Yong, C., Shen, M., & Han, B. (2016). Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *Journal of Dairy Science*, 99(12): 9560–9569.
- Windria, S., Widianingrum, D. C., & Salasia, S. I. O. (2016). Identification of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolates from mastitis milk of etawa crossbred goat. *Research Journal of microbiology*, 11(1), 11.

Windria, S., Wiraswati, H. L., Ramadhanti, J., Tyas, T. K. A., & Wismandanu, O. (2018). Penyuluhan Mastitis Subklinis pada Sapi Perah di Desa Mekar Bakti Kecamatan

Pamulihan Kabupaten Sumedang Jawa Barat. *Dharmakarya: Jurnal Aplikasi Ipteks untuk Masyarakat*. Vol. 7, No. 2: 138 - 140