



Judul Ade
Nama beda

LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN A
SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI DARI STAPHYLOCOCCUS
AUREUS PADA KASUS MASTITIS SAPI PERAH**

Oleh:

Drh. Mustofa Helmi Effendi, DTAPH.

Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK.

Dr. A.T. Soelih E., Drh.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat

Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005

Nomor Urut : 9.

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005



LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN A
SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI DARI STAPHYLOCOCCUS
AUREUS PADA KASUS MASTITIS SAPI PERAH**

Oleh:

Drh. Mustofa Helmi Effendi, DTAPH.

Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK.

Dr. A.T.Soelih E., Drh.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat

Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005

Nomor Urut : 9.

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DASAR**

1. Judul Penelitian	: Isolasi dan Identifikasi Gen Penyandi Protein A sebagai Faktor Virulensi dari <i>Staphylococcus aureus</i> pada Kasus Mastitis Sapi Perah
a. Macam Penelitian	: () Fundamental () Terapan () Pengembangan
b. Kategori Penelitian	: () I () II () III
<hr/>	
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap	: Drh. Mustofa Helmi Effendi, DTAPH.
b. Jenis Kelamin	: Pria
c. Pangkat/ Golongan dan NIP	: Penata Tk I , III d, 131 760 377
d. Jabatan	: Lektor
e. Fakultas	: Kedokteran Hewan
f. Universitas	: Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang Diteliti	: Ilmu Pertanian
<hr/>	
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 orang
<hr/>	
4. Lokasi Penelitian	: Fakultas Kedokteran Hewan - Unair, Surabaya
<hr/>	
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
<hr/>	
6. Jangka waktu penelitian	: 6 bulan, sejak penelitian diterima
<hr/>	
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 15.000.000,- (Lima belas juta rupiah)

Surabaya, 10 November 2005

Mengetahui :
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Prof. Dr. Ismudiono, MS.
Nip. 130 687 297

Ketua Peneliti

Drh. Mustofa Helmi Effendi, DTAPH.
Nip. 131 760 377

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
Nip. 130 701 125

RINGKASAN

Mastitis adalah peradangan pada ambing dan umumnya berdampak paling jelek pada peternakan sapi perah yang terkait dengan masalah ekonomi dan produktivitas ternak. Penyakit tersebut tidak dapat diberantas tetapi dapat diturunkan angka kejadiannya dengan manajemen yang baik pada peternakan sapi perah tersebut. Mastitis menyebabkan kerugian ekonomi pada petani dengan beberapa jalan; hasil susu yang menurun, kualitas susu menjadi jelek atau terkontaminasi dengan antibiotika yang mengakibatkan produknya tidak dapat dijual, adanya biaya pengobatan, tingginya angka pengafkiran dan kadang-kadang mengakibatkan kematian. Susu yang diproses dalam industri juga merugi disebabkan oleh masalah kandungan antibiotika dalam susu yang dapat menurunkan kandungan kimiawi susu dan kualitas susu dari sapi perah penderita mastitis.

Pemahaman tentang epidemiologi dari *Staphylococcus aureus* yang meliputi sumber penularan, alur penularan dan faktor resiko menghasilkan sistem pengendalian mastitis yang baik dengan agen penyakit *Staphylococcus aureus* di beberapa peternakan. Hal penting dari pengendalian *Staphylococcus aureus* adalah menyadari bahwa bakteri ini ditularkan dari sapi ke sapi selama proses pemerahan. Langkah higienis selama waktu pemerahan menurunkan perpindahan bakteri dari sapi ke sapi yang berdampak penurunan *intramammary infection* (IMI) yang baru. Tetapi hanya dengan sistem higienis pemerahan saja tidak cukup baik untuk pengendalian penyakit ini. Dengan tambahan pengobatan pada waktu kering dan khususnya pengafkiran bagi yang terinfeksi kronis diperlukan untuk menurunkan IMI oleh *Staphylococcus aureus*. Pengetahuan yang detail tentang bakteri *Staphylococcus aureus* akan memperoleh gambaran bahwa pemberantasan pada saat ini masih belum memungkinkan, khususnya adanya *Staphylococcus aureus* yang memproduksi beberapa faktor virulensi. Jadi investigasi dalam tingkat biologi molekuler harus dilakukan untuk pemecahan masalah mastitis.

Pada penelitian ini digunakan 98 sampel sapi perah yang diambil susunya untuk diperiksa angka prevalensi mastitis pada Peternakan Nongkojajar. Dari sampel susu mastitis dilakukan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* yang meliputi bentuk mikroskopis kokus bergerombol, sifat hemolisis tipe β , katalase (+), koagulase (+) dan Gram (+). Karakterisasi biologi molekuler *Staphylococcus aureus* dengan mempergunakan pendekatan gen penyandi protein A dengan metode PCR, ekspresi gen protein A dengan metode SDS-PAGE.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa data prevalensi mastitis sapi perah dari peternakan sapi perah Nongkojajar dengan angka prevalensi 82,7%. Dengan pendekatan genotipik memakai bobot molekul gen penyandi protein A didapatkan gen penyandi dengan BM 110 bp. Hasil ekspresi dari gen penyandi protein A ditemukan dengan BM 55 kD.

SUMMARY

Mastitis is an inflammation of the udder and is common in dairy herds causing important economic losses. It cannot be eradicated but can be reduced to low levels by good management of dairy cows. Mastitis causes direct economic losses to farmers in several ways; milk yields are reduced, milk that is abnormal or contaminated with antibiotics is unsaleable, there are veterinary and antibiotic costs, a higher culling rate and occasional fatalities. The milk processing industry also incurs losses because of problems that result from antibiotic in milk, and the reduced chemical and bacterial quality of mastitic milk.

Understanding the epidemiology of *Staphylococcus aureus* (reservoirs, transmission pathways, and risk factors) has resulted in excellent control of this major mastitis pathogen in many herds. The major breakthrough in controlling *S. aureus* came with the realization that it was primarily transmitted from cow to cow during the milking process. Milking time hygiene measures that decreased cow to cow transfer were largely responsible for decreasing new *S. aureus* intramammary infections (IMI). However, milking time hygiene alone was insufficient in controlling the disease. The addition of dry-cow therapy, and especially, culling the chronically infected were needed to achieve low levels of *S. aureus* IMI. The knowledge of the sources of *S. aureus* would suggest that total eradication is not currently possible, especially *S. aureus* produce virulence factors. Therefore, investigation in molecular biology level on *S. aureus* should be done to solve mastitis problems.

The experiment was used 98 cows that collected for prevalence rate of mastitis on Nongkojajar dairy herd. From mastitic milk samples were identified isolate *S. aureus* by Staphylococci are perfectly spherical cells about 1 micrometer in diameter and grow in clusters, β hemolysis, coagulase (+), catalase (+) and Gram (+). Identification of encoding gene for protein A by PCR and genes expression by SDS-PAGE electrophoresis.

The result showed that prevalence rate of bovine mastitis on Nongkojajar dairy herd was 82,7%.. Molecular size of encoding gene for protein A is 110 bp. The characterization of expression of genes for protein A showed that there is 55 kD.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, penulis ucapkan yang disebabkan dapat menyelesaikan penulisan laporan hasil penelitian ini dengan lancar. Dengan harapan, semoga tulisan ini dapat meningkatkan pengetahuan kita di bidang pengendalian mastitis pada sapi perah dengan pendekatan pada aspek genetik.

Penelitian yang berjudul " Isolasi dan Identifikasi Gen Penyandi Protein A sebagai Faktor Virulensi dari *Staphylococcus aureus* pada Kasus Mastitis Sapi Perah" dilakukan dengan tujuan meningkatkan pengetahuan tentang faktor virulensi dari aspek biologi molekuler dari *Staphylococcus aureus*. Sehingga dapat diketahui ekspresi protein yang bertanggung jawab terhadap patogenesis infeksi mastitis pada sapi perah.

Penelitian ini dilaksanakan atas dasar Kontrak Penelitian dengan Rektor Universitas Airlangga No: 729/ JO3.2/ PG/ 2005 dan atas biaya dari dana DP3M Ditjen Depdiknas tahun tahun 2005. Atas kesempatan untuk melakukan penelitian ini penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Puruhito
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga,
Prof. Dr. Ismudiono, M.S. Drh.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
4. Ketua Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner beserta staf.

5. Dra. Budiastuti, Apt yang telah banyak membantu dalam koleksi sampel susu mastitis dan juga mendorong untuk cepat diselesaikannya laporan penelitian.

Semoga tulisan ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Amien.

Surabaya, 10 November 2005

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMMARY	ii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	23
IV. METODE PENELITIAN	25
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran1: Daftar Singkatan	45
Lampiran 2 : Faktor Virulensi <i>Staphylococcus aureus</i> berupa <i>adhesin</i>	46
Lampiran 3 : Faktor Virulensi <i>Staphylococcus aureus</i> yang berupa toksin dan Invasin	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Penelitian

Usaha untuk meningkatkan produksi susu telah dilaksanakan oleh pemerintah, antara lain melalui peningkatan mutu genetik, pembinaan sumber bibit, pembinaan makanan ternak serta pengamanan ternak dan hasil-hasilnya meliputi pencegahan, pengendalian dan pemberantasan penyakit ternak, dan pembinaan usaha peternakan sapi perah. Usaha peningkatan produksi susu harus juga diimbangi dengan peningkatan kualitas susu dan keamanan bagi penggunaannya.

Susu merupakan bahan makanan yang mengandung gizi tinggi dan lengkap untuk tubuh manusia. Kandungan gizi yang tinggi juga merupakan media yang sangat baik bagi pertumbuhan dan perkembang-biakan kuman, baik kuman yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan manusia, kuman penyebab kerusakan susu maupun penyebab mastitis.

Mastitis adalah peradangan jaringan interna kelenjar susu atau ambing dengan variasi penyebab, derajat keparahan, lama penyakit dan akibat penyakit yang sangat beragam. Secara garis besar mastitis terbagi atas mastitis klinis dan mastitis subklinis. Mastitis klinis senantiasa diikuti tanda klinis baik berupa pembengkakan, pengerasan ambing, rasa sakit, panas, kemerahan sampai penurunan fungsi ambing. Sedangkan mastitis subklinis adalah mastitis yang tidak menampakkan perubahan yang nyata pada ambing dan susu yang

dihasilkannya, hanya produksi susu turun sehingga peternak kerap kali terlambat menyadari. Untuk itulah diperlukan pengendalian penyakit mastitis yang melibatkan pengkajian dari berbagai aspek.

Proses mastitis senantiasa dikaitkan dengan tiga faktor yaitu sapi, agen penyakit dan lingkungan. Resiko terjadinya mastitis terletak pada ketidakseimbangan ke tiga faktor tersebut. Mastitis terjadi sebagian besar akibat masuknya kuman patogen melalui lubang puting susu, kemudian berkembang di dalamnya lalu terjadilah mastitis.

Data mengenai kasus mastitis di Indonesia, telah banyak dilaporkan. Tingginya kasus mastitis subklinis sering dikaitkan dengan faktor yang mempermudah terjadinya mastitis seperti luka lecet pada ambing akibat pemerahan yang salah dan kasar, sanitasi yang buruk. Beberapa data menampilkan persentase kejadian mastitis subklinis cukup tinggi, seperti di tahun 1983 tercatat 67% mastitis subklinis di pulau Jawa dan tahun 1987 lebih dari 80% sapi yang diperiksa di DKI Jakarta menderita mastitis subklinis. Selanjutnya dari tahun 1989 sampai dengan tahun 1996 persentase mastitis subklinis baik di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur berkisar 80 – 90%. Data tahun 1999 di Jawa Barat terutama Kabupaten Bogor dan sekitarnya tercatat 70% dari sapi-sapi yang diperiksa menderita mastitis subklinis (Sudarmanto, 1999).

Kerugian ekonomi secara umum yang diakibatkan mastitis subklinis, meliputi penurunan produksi, penurunan mutu susu, pembuangan susu, biaya perawatan dan pengobatan, pengafkiran ternak lebih awal serta pembelian sapi

perah baru. Penurunan produksi susu akibat mastitis sangat bervariasi antara 10 – 40%.

Untuk mengurangi kerugian ekonomi tersebut perlu dilakukan pengendalian mastitis secara tepat dan efisien. Pengendalian mastitis yang sering dilakukan oleh para peternak di Jawa Timur (Sudarmanto, 1999) adalah sebagai berikut : mencuci tangan sebelum pemerahan dengan larutan desinfektan; melakukan pemerahan dengan baik dan benar tanpa bahan pelicin dengan pemerahan sampai kosong; melakukan pencelupan puting ke dalam larutan desinfektan setelah selesai pemerahan; sapi yang menderita mastitis diperah terakhir dan harus dikeluarkan dari kandang bila tidak sembuh dengan pengobatan; melakukan pencegahan dengan pemberian antibiotika dalam masa kering kandang; melakukan pemeriksaan secara rutin terhadap kejadian mastitis; dan mengukur produksi susu sapi per ekor per hari secara teratur.

Di Indonesia, dengan tingginya angka mastitis yang mengakibatkan banyaknya kerugian peternak, maka pengembangan sistem pengendalian mastitis merupakan tujuan yang tepat. Harapan dari pengembangan sistem pengendalian tidak akan berhasil tanpa adanya dukungan data yang lengkap mengenai faktor virulensi yang terkait dengan *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari mastitis. Salah satu faktor virulensi yang penting dalam proses infeksi awal mastitis pada sapi perah adalah protein A dari *Staphylococcus aureus*. Untuk itulah pemahaman tentang epidemiologi molekuler dari pendekatan genotipik maupun fenotipik *Staphylococcus aureus* yang memproduksi berbagai faktor virulensi telah dilaporkan terkait dengan penyakit

pada manusia dan penyebab utama mastitis pada sapi perah sehingga penyediaan data pendukungnya merupakan keniscayaan.

1.2. Rumusan Masalah

Dalam usaha memanfaatkan potensi susu sebagai sumber makanan bermutu tinggi, maka di dalam penelitian ini akan dicoba untuk mengetahui identifikasi dan karakterisasi gen penyandi protein A dari agen penyebab terjadinya mastitis pada sapi perah.

Adapun usaha mengetahui identifikasi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah tersebut di atas, timbul beberapa permasalahan :

1. Apakah terjadi perbedaan identifikasi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar?
2. Apakah terjadi perbedaan karakterisasi ekspresi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mastitis

Mastitis adalah sebuah reaksi peradangan dari jaringan ambing sapi perah terhadap serangan bakteri, kimiawi, suhu atau mekanik. Mastitis mungkin infeksius yang disebabkan oleh mikroorganisme atau non infeksius yang berasal dari luka fisik pada glandula mammae. Respon peradangan terdiri dari peningkatan protein darah dan sel darah putih dalam jaringan glandula mammae dan di susu. Tujuan dari respon tersebut adalah untuk merusak penyebab iritasi, memperbaiki kerusakan jaringan dan mengembalikan ambing ke fungsi normal (Anonimous, 2003).

Mastitis menurut cara penyebarannya dibagi dua yaitu mastitis kontagiosa dan mastitis lingkungan. Mastitis kontagiosa merujuk pada sistem penularan dari sapi ke sapi. Habitat utama bakteri yang menyebabkan mastitis terletak pada kulit ambing dan luka putting. Mastitis kontagiosa sering berbentuk mastitis subklinis. Infeksi ditularkan melalui peralatan pemerahan, termasuk dari tangan pemerah. Mayoritas bakteri penyebab mastitis kontagiosa adalah *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae* (Morin and Hurley, 2003)

Mastitis lingkungan merujuk pada sistem penularan dari lingkungan ke sapi. Bakteri dari lingkungan menyebabkan terjadinya mastitis pada sapi perah. Angka kejadian mastitis lingkungan cenderung meningkat yang disebabkan sanitasi lingkungan yang jelek. Habitat utama bakteri penyebab mastitis

lingkungan adalah ditemukan di lingkungan termasuk di feses, tanah, air dan jerami untuk tidurnya sapi. Mayoritas bakteri penyebab mastitis lingkungan adalah bakteri coliform, *Streptococcal* spesies dan *Pseudomonas* spesies (Morin and Hurley, 2003).

Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* sukar dikontrol hanya dengan pengobatan saja. Suksesnya pengontrolan diperoleh hanya melalui pencegahan infeksi baru dan pengafkiran sapi perah yang terinfeksi. *Staphylococcus aureus* mengkolonisasi ujung puting dan luka puting. Organisme ini mungkin penetrasi ke kanal puting pada waktu pemerahan. Sapi perah yang terinfeksi harus diafkir atau dipisahkan dari peternakan sapi perah sapi perah (Jones, 1998).

Staphylococcus aureus merupakan penyebab terbesar mastitis kronis. Sering terjadi secara subklinis dimana tidak tampak perubahan pada susu maupun pada ambing, tetapi terjadi peningkatan *somatic cell count* (SCC) (Roberson, 1994).

Staphylococcus aureus memproduksi beberapa faktor virulensi yang dapat merusak glandula mammae. Leukosit tertarik ke daerah radang untuk menghentikan infeksi. Pada awalnya bakteri merusak jaringan dalam puting dan *gland cisterna* dalam kuartir ambing. Kemudian masuk ke dalam sistem saluran dan membentuk poket infeksi di sekitar alveoli, diikuti dengan pelepasan atau kerusakan alveoli dan membentuk abses (Jones, 1998). Hal ini menyebabkan rendahnya efektifitas antibiotika terhadap mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus*.

2.1.1. Organisme Penyebab Mastitis

Mastitis dapat disebabkan oleh bakteri patogen yang berasal dari lingkungan dan kontagiosa. Mastitis kontagiosa terjadi dengan organisme yang disebarkan dari kuarter yang terinfeksi ke kuarter lainnya yang sering terjadi pada proses pemerahan susu. Organisme dari lingkungan umumnya merupakan organisme yang berasal di lingkungan kandang sapi perah. Infeksi dapat terjadi disetiap waktu antara lain waktu pemerahan, masa kering, sebelum melahirkan (Bramley *et al.*, 1996).

2.1.1.1. Mastitis Kontagiosa

Mastitis kontagiosa didefinisikan sebagai mastitis yang ditransmisikan langsung dari sapi ke sapi lainnya (Erskine, 2001). Angka insidensi dari mastitis kontagiosa tergantung dari jumlah dan tipe mikroorganisme yang menyerang sapi perah dan juga tergantung pada hambatan fisik dan sistem kekebalan yang dimiliki oleh sapi perah. Meskipun beberapa perbedaan tipe dari bakteri penyebab mastitis, angka prevalensi mastitis yang tinggi disebabkan oleh bakteri yang umumnya ditemukan di sekitar peternakan (Bramley *et al.*, 1996).

Paling umum mastitis kontagiosa di berbagai negara disebabkan oleh *S.aureus*, *Str. agalactiae*, *Corynebacterium bovis* dan spesies *Mycoplasma*. *S. aureus* umumnya dianggap sebagai penyebab mastitis terbanyak. Diperkirakan sekitar 7 - 40% sapi perah terinfeksi oleh *S. aureus* (Erskine, 2001) yang terdapat dalam susu dari kelenjar susu yang terinfeksi dan menyebar pada saat

pemerahan baik dengan tangan maupun dengan mesin pemerah. Patogen dapat mengkolonisasi dan berkembang dalam puting susu yang luka dan di dalam saluran puting susu yang dapat meningkatkan tingkat paparan puting susu ke bakteri (Fox *et al.*, 2000). Bakteri ini pada umumnya menyebabkan infeksi kronis yang berbentuk mastitis subklinis dan adakalanya menjadi klinis ketika susu abnormal dapat dideteksi.

Infeksi sistemik yang disertai dengan hilangnya selera makan dan meningkatnya temperatur badan adalah jarang terjadi. Antibiotika yang tepat dapat diberikan ke dalam ambung yang mengalami mastitis klinis dan hampir selalu memberikan kesembuhan terutama bila penyebabnya *Str. agalactiae*, tetapi jarang sembuh bila infeksi dengan penyebabnya *Staphylococcus aureus* (Matthews *et al.*, 1994).

2.1.1.2. Mastitis Lingkungan

Organisme yang merupakan penyebab utama mastitis lingkungan adalah bakteri gram negatif, yang termasuk di dalamnya adalah coliforms dan streptococci lingkungan. Bakteri gram negatif terdiri dari *Escherisia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus* dan *Actinomyces pyogenes* (Bramley *et al.*, 1996). Streptococci lingkungan termasuk di dalamnya adalah *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* dan *Streptococcus equinus*. Infeksi disebabkan oleh *Str. uberis* dan *E. coli* adalah paling sering sebagai penyebab mastitis lingkungan. Umumnya infeksi yang disebabkan oleh patogen coliforms menghasilkan mastitis akut bila

dibandingkan dengan infeksi yang disebabkan patogen kontagiosa dan Streptococci lingkungan, tetapi infeksi yang disebabkan patogen coliforms umumnya berlangsung sebentar kurang dari 7 hari (Barker *et al.*, 1998).

Infeksi Streptococci lingkungan umumnya kurang dari 30 hari. Sekitar 80% infeksi mastitis yang disebabkan gram negatif bermanifestasi klinis, sedangkan 50% infeksi mastitis yang disebabkan Streptococci lingkungan yang bermanifestasi klinis (Bramley *et al.*, 1996).

Str. dysgalactiae Streptococcus yang serupa dengan *Str. agalactiae*, dapat mengkolonisasi dan multiplikasi pada luka puting susu tetapi lokasinya yang utama bukanlah susu dari kuater yang terinfeksi, tetapi lokasi lain pada sapi perah (Barker *et al.*, 1998). Klinis infeksiya tidaklah berlainan dibandingkan dengan *Str. agalactiae* dan respon pengobatan dengan antibiotika baik.

2.1.2. Dampak Ekonomi Mastitis

Mastitis adalah penyakit yang paling banyak mengeluarkan biaya pada peternakan sapi perah (Jaenicke *et al.*, 1999). Biaya tersebut terkait dengan penyakitnya termasuk susu yang terbuang, pengafkiran dini, ongkos dokter hewan dan yang terpenting yaitu penurunan kuantitas dan kualitas dari susu dan produk susu lainnya seperti keju, mentega atau krim (Jones *et al.*, 1984). Ada beberapa cara untuk mengestimasi hilangnya produksi susu oleh mastitis. Kalkulasi dapat dibuat berdasarkan SCC pada susu, komparasi hasil antar peternakan, komparasi hasil antar sapi perah dan komparasi hasil antar kuarter pada individu sapi perah (Jones *et al.*, 1984).

Penurunan produksi susu ditaksir sekitar 75% pada mastitis subklinis (Oliver *et al.*, 2003). Mastitis subklinis dapat lebih penting secara ekonomis dibandingkan dengan mastitis klinis karena faktor produksi susu lebih menyebar. Total kerugian produksi susu tiap kuartar yang disebabkan mastitis subklinis sekitar 10 – 26%.

Mastitis klinis menyebabkan hilangnya produksi susu yang terjadi pada laktasi awal. Kuartar ambung yang mengalami mastitis klinis jarang tersembuhkan dengan baik sehingga mengakibatkan kerugian berkepanjangan. Jenis organisme penyebab mastitis tampaknya merupakan faktor minor yang berpengaruh pada hilangnya produksi susu (Oliver *et al.*, 2003).

Kerugian ekonomi yang dihitung sekitar 200 Dollar per sapi perah per tahun di Amerika Serikat. Sekitar 10% kerugian dari angka penjualan susu disebabkan oleh penurunan produksi, peningkatan biaya penggantian sapi, pembuangan susu, biaya pengobatan, biaya dokter hewan dan perawatan (Oliver *et al.*, 2003). Biaya dari mastitis klinis juga diperkirakan sekitar 107 Dollar per kasus mastitis dan lebih dari 70% biaya terkait dengan penurunan produksi susu, pembuangan susu serta lebih dari 20% terkait dengan obat, biaya dokter hewan dan perawatan (Jaenicke *et al.*, 1999).

2.1.3. Pengendalian Mastitis dan Pengobatan

Mastitis adalah suatu peradangan pada ambung yang menyebabkan kerugian ekonomi penting. Penyakit ini tidak bisa dibasmi tetapi dapat dikurangi menjadi tingkat rendah oleh sistem manajemen yang baik pada peternakan sapi

perah. Beberapa penyebab mastitis hanya infeksi dan peradangan oleh bakteri adalah yang terpenting. Walaupun bakteri, jamur, ragi dan mungkin virus dapat menyebabkan infeksi dan peradangan pada ambing, tetapi agen yang utama adalah bakteri. Bakteri yang paling umum adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis* dan *Escherichia coli* meskipun yang lain dapat menyebabkan mastitis (Bramley *et al.*, 1996). Mastitis terjadi ketika puting susu para sapi dipaparkan ke patogen yang menembus saluran pipa puting susu dan menyebabkan infeksi dan peradangan di dalam satu atau lebih kuartar ambing (Fox *et al.*, 1995). Keadaan suatu infeksi dan peradangan bervariasi, paling umum berupa mastitis subklinis. Dengan beberapa patogen, secara khas *E coli*, infeksi dan peradangan sering lebih akut dan di sana adalah suatu endotoxaemia umum dengan temperatur badan meningkat, hilangnya selera dan sapi akan mati kecuali jika pengobatan yang mendukung diberikan. Pengobatan yang efektif adalah pemberian antibiotika melalui saluran pipa puting susu. Ini hampir selalu memperbaiki penyakit yang klinis dan sering juga menghapuskan infeksi dan peradangan yang disebabkan bakteri (Oliver *et al.*, 1992).

Infeksi dan peradangan dapat sembuh secara spontan tetapi paling tetap berlaku untuk dihapuskan secepatnya oleh antibiotika. Kepekaan sapi bervariasi terhadap infeksi dan peradangan baru, paling umum sapi lebih tua di awal masa laktasi, di awal periode kering dan ketika manajemen peliharaan tidak higienis (Oliver *et al.*, 1992).

Metode pengendalian sekarang ini ditumpukan pada sistem pencegahan yang meliputi higiene pemerahan yang baik, pengurangan ke paparan patogen lingkungan, pengobatan antibiotika pada masa kering dan pengafkiran dan ditunjang dengan pengaobatan pada kasus mastitis klinis (Owens *et al.*, 2001). Pengurangan kejadian mastitis dapat dicapai dengan penurunan paparan ujung puting ke patogen lingkungan atau peningkatan resistensi sapi perah terhadap IMI. Pengurangan paparan ke lingkungan dapat dilakukan dengan pengkandangan yang baik pada masa kering, sapi dara dan tempat melahirkan anak dan juga pemberian selimut tidur dari bahan inorganik dan ventilasi kandang yang cukup (Schrick *et al.*, 2001).

Mastitis penyebab kerugian ekonomi para peternak dengan beberapa jalan, antara lain; penurunan produksi susu, kualitas susu yang abnormal atau mencemari dengan antibiotika, biaya dokter hewan dan biaya-biaya pengobatan, dan kematian (Oliver *et al.*, 2003). Susu yang diproses di industri juga membuat rugi oleh karena permasalahan yang diakibatkan oleh antibiotika di dalam susu, dan kandungan gizi berkurang yang merupakan hasil bakteri dari kasus mastitis.

Pertahanan selular dan pertahanan kebal dan sebagai tambahan ada pertahanan tidak spesifik yang disajikan oleh sistem biokimia kompleks yang mencakup enzim dan lain unsur susu. Walaupun jenis infeksi cenderung untuk tetap ada selama berbulan-bulan jika tidak diperlakukan selular pertahanan akan menghapuskan infeksi oleh *E. coli* (Nickerson, 1988).

Kesembuhan secara spontan pada kasus mastitis jarang terjadi. Terbukti penggunaan antibiotika dalam pengobatan mastitis adalah suatu utama kemajuan

dalam pengendalian sapi perah mastitis. Pemberian antibiotika via saluran pipa puting susu ke dalam ambing adalah suatu sederhana menanggulangi hampir semua klinis mastitis dan dapat menghapuskan infeksi (Owens *et al.*, 1988). Efektivitas obat akan tergantung sebagian pada kepekaan patogen terhadap obat dan juga kepada cara obat diberkasiat. Ini mempengaruhi penyerapan, distribusi, metabolisme dan pengeluaran obat dari susu. Tidak ada antimikrobia yang ideal untuk semua kondisi mastitis (dengan kata lain. ' spektrum lebar') untuk digunakan pada sapi laktasi dan para sapi kering. Hampir semua pengobatan diberi tanpa pengetahuan tentang agen patogen penyebab mastitis.

Pengobatan antibiotika pada umumnya diberikan melalui saluran pipa puting susu tetapi ini harus dilaksanakan hanya setelah hati-hati dengan membersihkan mulut puting susu dengan suatu kain penyeka obat pembasmi hama. Pengobatan mastitis dapat dilakukan dengan 2 atau 3 suntikan pada 24 interval jam, dan menolak susu dari sapi untuk 2 atau lebih hari setelah pengobatan yang terakhir untuk menghindari pencemaran antibiotika susu (Owens and Nickerson, 1990).

2.1.4. Proses Terjadinya Mastitis

Infeksi kelenjar susu dapat terjadi dengan beberapa tahap antara lain yang penting adalah: kulit puting susu untuk dicemari dengan patogen, patogen dapat menembus saluran pipa puting susu, infeksi dan peradangan terjadi pada saluran pipa puting dan kelenjar susu (Jones, 1998).

Semua ambing sapi perah yang secara terus menerus terpapar ke patogen dapat menyebabkan mastitis tetapi infeksi baru secara normal jarang. Hal ini disebabkan paparan ke patogen pada umumnya kecil. Banyaknya patogen pada padang rumput yang bersih sangat kecil. Paparan puting susu para sapi untuk *S. aureus*, *Str. agalactiae* dan *Str. dysgalactiae* akan sangat meningkat ketika puting susu yang sakit dan luka pada saluran pipa puting susu dikolonisasi oleh mastitis patogen atau ketika sapi berbaring diatas kandang atau selimut dicemari bakteri patogen (Owens *et al.*, 2001). Adakalanya paparan akan ditingkatkan dari peralatan pemerahan susu yang kurang bersih atau melalui pencucian ambing dengan air yang tercemar. Hal Ini dapat dihindarkan dengan mengadopsi metoda sederhana dengan membersihkan peralatan tepat.

Cara yang paling efektif mengurangi paparan *S. aureus*, *Str. agalactiae* dan *Str. dysgalactiae* adalah dengan mencelupkan atau penyemprotan puting susu dengan obat pembasmi hama yang langsung seketika setelah pemerahan susu (Jones, 1998). Sejumlah obat pembasmi hama produk ada tersedia dan hasil baik diperoleh dengan hipoklorit, iodophor dan chlorhexidine. Penyuci hamaan puting susu sangat mengurangi pencemaran bersifat sisa dan lebih penting lagi mendorong penyembuhan puting susu yang sakit dan luka dan juga mencegah pertumbuhan patogen di dalam saluran pipa puting susu. Praktek seperti mencuci ambing dengan obat pembasmi hama, pembilasan peralatan yang pemerah susu, pembilasan punggung akan juga mengurangi paparan tetapi efek mereka lebih kecil dibanding puting susu yang dicelupkan sebab tidak mempengaruhi kolonisasi puting susu dan saluran pipa. Untuk memelihara untuk

tingkat rendah paparan adalah paling utama dengan memelihara kulit puting susu sehat dan menghindari hal yang menyebabkan luka puting (Jones, 1998)..

Saluran pipa puting susu yang sehat sangat efektif mencegah jalan lintasan patogen ke dalam ambing dan merupakan penghalang alami melawan terhadap mastitis, dan tidak hanya bertindak sebagai suatu penghalang fisik melawan terhadap penetrasi tetapi lapisan saluran pipa juga berisi pengeluaran zat yang menghalangi pertumbuhan hasil bakteri (Owens *et al.*, 2001). Penetrasi patogen dapat terjadi pada waktu pemerahan susu, di dalam interval antara pemerahan susu dan bahkan ketika sapi tidak menyusui. Jika patogen menembus pada waktu pemerahan susu, mereka mungkin dibilas ke luar jika tidak infeksi pada umumnya terjadi (Owens *et al.*, 2001).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah kuman gram positive dan termasuk anggota famili Micrococcaceae yang pathogen (Todar, 2002), berbentuk menyerupai buah anggur. Todar (2002) menggambarkan dua macam koloni dari staphylococci yang penting yaitu *Staphylococcus aureus* berwarna kuning dan *Staphylococcus epidermidis* berwarna putih yang keduanya merupakan spesies penting yang terkait dengan kesehatan manusia. *Staphylococcus aureus* umumnya ditemukan pada saluran nafas dan mungkin pada lokasi lainnya, sedangkan *Staphylococcus epidermidis* ditemukan di permukaan kulit.

Staphylococcus aureus sering menyebabkan mastitis pada sapi perah (Akineden *et al.*, 2001). Kuman ini juga merupakan penyebab gangguan kulit dan

jaringan lunak (Lowy, 1998), beberapa infeksi termasuk di dalamnya *bacteraemia*; *endocarditic*; *sepsis*, dan *toxic-shock syndrome* (TSS) pada manusia. *S. aureus* juga penyebab *food poisoning* yang menyebabkan muntah dan atau diarrhea melalui pengeluaran *enterotoxin* ke makanan (Todar, 2002).

2.3. Faktor Virulensi

Menurut Landolo (1989) menyatakan bahwa faktor virulensi *S. aureus* merupakan multifaktor. Masing-masing faktor virulensi berperan penting dalam tahap yang berbeda pada proses infeksi. Pada tahap proses infeksi yang dini, faktor yang terkait dalam penempelan bakteri ke sel atau matrik ekstra selluler dianggap merupakan faktor penting, sementara faktor yang terkait dengan invasi dan penyebaran ke mekanisme pertahanan host belum berperan. Lebih dari 40 ekstra selluler dan *cell-surface associated proteins* telah diidentifikasi yang terkait faktor virulensi. Berdasarkan pada aktivitas biologis, faktor virulensi dapat dibagi menjadi tiga fungsi yaitu a). berperan sebagai mediasi adhesi bakteri ke sel atau jaringan, b). mempromosi invasi dan penyebaran bakteri, c). memproteksi bakteri dari sistem pertahanan host. Beberapa faktor virulensi mempunyai lebih dari satu fungsi seperti alpha-hemolysin dan *fibrinogen binding proteins*. Alpha-hemolysin mempunyai kemampuan untuk mempromosi invasi bakteri dengan menghancurkan sel jaringan, tahan terhadap *monocytes* dan *neutrophils* serta mampu sebagai *immune escape factor* (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991). *Fibrinogen binding proteins* dapat merangsang penempelan bakteri ke permukaan sel host dan juga berfungsi sebagai *immuno protection*

factor melalui pembungkusan bakteri dengan *soluble fibrinogen* (Wann et al., 2000).

Pathologi dari penyakit *S. aureus* adalah sangat bervariasi tergantung dari peran faktor virulensi. Pada endocarditis dengan tikus sebagai model, *fibronectin binding protein* (Schenning et al. 1993), *capsular polysaccharide* (Lee et al., 1997), *clumping factor* (Moreillon et al., 1995) dan *collagen adhesin* (Heinz et al., 1996) merupakan faktor penting untuk pathogenesis. Pada infeksi luka dengan tikus sebagai model ditemukan bahwa *fibrinogen binding proteins* sebagai faktor yang penting (Palma et al., 1996). Pada model *murine septic arthritis* yang terbukti berperan penting adalah *collagen adhesin* (Patti et al., 1994) dan *polysaccharide capsule* (Nilsson et al., 1997).

Gen penting untuk mempertahankan diri *in vivo* telah diidentifikasi dengan menggunakan *signature-tagged mutagenesis* (STM) dan *in vivo expression technology* (IVET). Mayoritas gen dengan STM teridentifikasi sebagai penyandi protein yang terkait dengan fungsi di dalam sel kuman seperti transportasi, energi, metabolisme dan biosintesis asam amino. Dengan IVET teridentifikasi tiga faktor virulensi yaitu gen penyandi *accessory gene regulator* (*agrA*), *glycerol ester hydrolase* (*geh*), dan tipe 8 *capsular polysaccharide* (*cap8*) (Lowe et al., 1998).

Dapat disimpulkan bahwa pathogenesis dari *S. aureus* adalah kompleks dan multifaktorial (Todar, 2002). Dalam penelitian Wisell (2000) melaporkan bahwa kebanyakan strain mutant yang kehilangan satu toksin mengalami perubahan yang sedikit pada tingkat virulensinya dan tetap patogen pada

hewan coba. Sedangkan strain yang rusak *global regulatory systems* berdampak pada ekspresi faktor virulensi yang mengakibatkan penurunan virulensi pada hewan coba.

2.4. Ekspresi dan Regulasi dari Faktor Virulensi

Potensi *S. aureus* dalam menimbulkan infeksi dapat dikaitkan dengan koordinasi regulasi temporal dari faktor virulensi. Pada awal infeksi *S. aureus*, faktor virulensi diekspresikan untuk adhesi pada sel hospes dan terjadi kolonisasi seperti kolagen, fibronectin adhesin dan protein A. Pada saat jumlah bakteri yang banyak di jaringan terinfeksi, ekspresi protein permukaan ditekan dan ekspresi exoprotein ditingkatkan. Hal ini terkait dengan regulasi gen-gen yang mengkoordinasi beberapa kelompok gen dan disebut *global regulatory genes*. Karakterisasi utamanya adalah oleh dua *pleiotropically acting regulatory* yaitu *agr* (*accessory gene regulator*) dan *Sar* (*staphylococcal accessory gene regulator*). Operon *agr* menyandi produksi beberapa protein yang berperan dalam signal *transduction pathway* yang menghasilkan peningkatan regulasi dari gen exoprotein dan penurunan dari gen protein permukaan (Rechtin, 1999).

Regulasi produksi toksin telah dipelajari lebih lanjut pada pengaruh lingkungan terhadap ekspresi dari α -haemolysin yang ekspresinya sangat tergantung dengan suhu. Telah dipelajari pula bahwa *Sar* juga memproduksi *active serine proteases* yang penting dalam pengaturan tingkat α -haemolysin juga protein pengikat fibronectin. Disimpulkan bahwa tingkat aerasi yang tinggi diperlukan untuk peningkatan ekspresi dan juga konsentrasi garam yang tinggi

berakibat penurunan ekspresi, hal ini menggambarkan koloni *S.aureus* tidak berbahaya pada kulit dan hidung yang disebabkan penghentian produksi α -haemolysin, enterotoxin C, ET-A dan Protein A (Iandolo, 1989).

Staphylococcus aureus menjadi bakteri yang penting disebabkan kemampuannya menghadapi sistem imun dari hospes maupun pengobatan antibiotika. Pada kasus pneumonia, kolonisasi dilakukan oleh bakteri dengan bantuan protein adhesin dan enzim ekstraselluler seperti *hyaluronidases*, *proteases*, *collagenases* yang memfasilitasi terjadinya invasi. Bakteri menghindari phagocytosis dengan ekspresi koagulase, *leukocidin*, *haemolysins*, katalase dan menahan respon imun dengan beberapa variasi antigenic yang merangsang luka lanjutan melalui cytotoxins. Proses serupa dapat dilihat pada luka operasi yang tergantung pada ekspresi temporal dari faktor virulensi. (Todar, 2002; Sheagren, 1984).

Sampai sekarang paling tidak telah diidentifikasi enam *global regulatory loci* yaitu *agr*, *sar A*, *sar H1*, *sae*, *rot* dan *1 E3* (Coulter, et al., 1998). Dengan menggunakan STM terlihat beberapa gen yang bertindak sebagai regulator dari faktor virulensi. *Staphylococcal alternative sigma factor*, σB terkait dalam regulasi faktor-faktor virulensi baik secara langsung (*coa* dan *clf A*) (Lindsay and Foster, 1999) atau melalui regulasi *sarA* dan *sar H1*.

Agr locus semula diidentifikasi sebagai chromosom Tn 551 dengan ekspresi peningkatan sekresi toksin dan enzim seperti alpha-hemolysin dan proteases, dan penurunan koagulase, protein A dan *cell wall associated proteins* (Morfeldt et al., 1996). Locus terdiri dari dua unit transkripsional; a) untuk

penyandi gen *agr* B, D, C dan A, dan b) untuk regulasi molekul RNA III. Gen *agr* A dan C adalah homolog terhadap protein yang terkait dengan *response regulators* dan *histidine protein kinase sensor* yang merupakan dua komponen untuk sistem signal transduksi. Membran yang ditempati *agr* C diaktivasi dengan *octapeptide pheromone* yang disandi oleh gen *agr* D dan dirancang untuk *auto inducing peptide* (AIP) (Lina *et al.*, 1998). *Agr* D dimodifikasi melalui keterkaitannya dengan protein *agr* B (Novick, 2000). Induksi sistem *agr* menyebabkan aktivasi transkripsi gen RNA III yang tampak sebagai ketergantungan *agr* terhadap regulasi gen virulensi (Novick *et al.*, 1993). RNA III juga merupakan mRNA yang menyandi delta-hemolysin (*hld*) (Janzon *et al.*, 1989).

RNA III merangsang 16 gen penyandi toksin dan enzim dan menekan tujuh gen penyandi surface associated protein (Tabel 1). Beberapa faktor virulensi tidak terpengaruh oleh *agr* seperti protein pengikat fibronectin B (*fnb* B), *clumping factor* A (*clf* A) dan enterotoxin A (*ent* A) (Gillaspy, *et al.*, 1997). Umumnya RNA III mengatur transkripsi mRNA. Pengaruh transkripsi langsung dari RNA III terjadi pada promotor gen dari *alpha hemolysin* (*hla*), beta hemolysin (*hlb*), protein A (*spa*), *exfoliative toxin* A (*eta* A) dan *toxic shock syndrome toxin-1* (*tst*) (Chan and Foster, 1998).

Locus regulasi yang kedua dengan efek pada produksi gen virulensi telah diidentifikasi oleh (Chan and Foster, 1998) adalah *sar* A. Mutant phenotype dari *sar* A menyebabkan peningkatan protease dan penurunan ekspresi *cell surface protein* (Chan and Foster, 1998). *Sar* A tidak mempunyai kesamaan dengan gen

regulator lainnya, dan ditranskripsi dari tiga promotor (P1, P2 dan P3). Promotor P1 dan P2 dikenal sebagai vegetative sigma factor, σ^A dan diekspresikan umumnya pada fase pertumbuhan eksponensial yang awal, sedangkan P3 dikenal sebagai alternative sigma factor, σ^{SB} yang diekspresikan pada fase pertumbuhan post eksponensial (Deora, *et al.*, 1997). Inaktivasi locus *sa* A menyebabkan lemahnya virulensi bakteri dalam beberapa hewan coba (Booth, *et al.*, 1997).

2.5. Pengaruh Faktor Lingkungan Terhadap Ekspresi Gen Penyandi Faktor Virulensi

Beberapa faktor lingkungan mempengaruhi ekspresi dari *exoprotein*. Glukosa telah memperlihatkan efek menekan pada produksi *exoprotein* (Coleman *et al.*, 1989). Khususnya glukosa menekan transkripsi enterotoksin A dan C (Regassa *et al.*, 1992), alpha-hemolysin (Ohlsen *et al.*, 1997; Chan and Foster, 1998), TSST-1 dan protein A (Chan and Foster, 1998). Penekanan pada *agr* tampak dengan glukosa pada pH di bawah 5,5 karena glukosa maupun pH 5,5, tidak menekan *agr* jika berfungsi sendiri-sendiri, dan ekspresi *agr* maksimal pada pH 7 sedangkan pH di atas 8 menekan ekspresi *agr* (Regassa *et al.*, 1992).

Efek penambahan Na Cl ke medium pertumbuhan bakteri juga dipelajari. Beberapa toksin termasuk enterotoksin B dan C (Regassa and Betly, 1993), exfoliative toxin A (*etaA*) (Dinges, 2000), alpha-hemolysin (Landolo, 1989), TSST-1 (Chan and Foster, 1998) ditekan oleh Na Cl dan juga produksi protein A (Chan and Foster, 1998), sedangkan transkripsi *serine protease* dirangsang (Landolo, 1989).

Penambahan logam chelator ke medium seperti EDTA dan EGTA menurunkan ekspresi dari protein A tetapi meningkatkan ekspresi TSST-1 (Chan and Foster, 1998) dan efek ion logam Mg^{2+} pada ekspresi TSST-1 masih kontroversi.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Berdasarkan pada rumusan masalah dan penelaahan studi kepustakaan yang telah diuraikan di atas dapat disusunlah tujuan penelitian ini dengan maksud menguji hipotesis yang diajukan :

1. Membuktikan adanya perbedaan identifikasi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar.
2. Membuktikan adanya perbedaan karakterisasi ekspresi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar.

3.2. Manfaat Penelitian

Pencarian agen penyebab mastitis *Staphylococcus aureus* akan menyebabkan peningkatan kesadaran masyarakat tentang pentingnya kesehatan puting susu untuk mencegah terjadinya mastitis.

Dengan pembuktian diketemukannya agen penyebab mastitis *Staphylococcus aureus* dan dilakukannya karakterisasi ekspresi protein diharapkan penelitian ini memberikan bahan informasi yang positif, dalam arti bahwa:

- 1) mastitis dapat dicegah dengan mengetahuinya agen penyebabnya.

- 2) sebagai sarana untuk meningkatkan pengetahuan tentang genetik maupun ekspresi protein *Staphylococcus aureus*, dengan harapan penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan sektor pertanian di sub-sektor peternakan sapi perah.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Metode Penelitian

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional lapangan yang menggunakan pendekatan survey untuk menentukan prevalensi mastitis dan dilanjutkan dengan isolasi salah satu agen penyebab mastitis yaitu *Staphylococcus aureus* serta diikuti penelitian dasar tentang identifikasi gen penyandi protein A dan karakterisasi ekspresi gen penyandi protein A..

Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa sampel susu yang diambil dari puting sapi perah yang menderita mastitis.

Bahan untuk penentuan mastitis subklinis digunakan California Mastitis Test yang merupakan standard bahan untuk deteksi mastitis subklinis (Jones, 1998)

Bahan untuk menentukan isolat *Staphylococcus aureus* murni secara laboratoris adalah Pewarna Gram, Manitol Salt Agar (MSA), Blood Agar, Hydrogen Peroksida dan Plasma darah kelinci.

Bahan untuk preparasi DNA adalah TE buffer, Lysostaphin dan proteinase K.

Bahan untuk amplifikasi PCR adalah Primer 1 dan 2, DNTPs, 10X buffer, Mg Cl₂, Taq polymerase dan air suling steril.

Bahan untuk electrophoresis adalah Agarose powder, TAE buffer, 100-bp DNA ladder, loading buffer dan ethidium bromide.

Bahan untuk electrophoresis SDS-PAGE adalah komposisi *separatin gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris H Cl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%), *stacking gel* 12% (0,66 ml acrylamide; 0,8 ml Tris H Cl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4µl Temed dan 20 µl APS 10%), electrophorsis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest), *Lammli buffer* , dan marker protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5 – 200 kDa produksi Bio Rad.

4.2. Prosedur Penelitian

Deteksi dan Diagnosis Mastitis

Berdasarkan visualisasi dan palpasi pada ambing. Dalam kasus mastitis klinis, ambing menjadi keras, kemerahan dan hangat. Palpasi pada ambing menyebabkan sapi kesakitan. Simptom ini merupakan perubahan dari sistem aliran darah di glandula mammae ketika terjadi peradangan.

Deteksi pada Somatic cells. Metoda yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah California Mastitis Test (CMT). Alat ini mendeteksi bentukan gel ketika DNA dalam somatic cells bereaksi dengan reagen. Reaksi terjadi pada paddle CMT dan dinilai secara subyektif (negatif, ringan, 1, 2, 3).

4.3. Koleksi sampel dan identifikasi

Sampel diperoleh dari susu sapi perah penderita mastitis di peternakan sapi perah sapi perah Nongkojajar dan Batu. Sampel dikultur pada media MS agar dan dilanjutkan sub kultur pada agar darah untuk diidentifikasi, bentuk mikroskopis kokus, sifat hemolisis β , katalase (+), koagulase (+) dan Gram (+).

4.4. Preparasi DNA

Untuk preparasi DNA diperlukan 5 – 10 koloni bakteri yang diinkubasi dalam 100 μ l TE buffer yang mengandung 5 μ l enzim lysostaphin selama 1 jam pada 37° C. Kemudian diberi perlakuan dengan 10 μ l proteinase K selama 2 jam pada 56° C. Selanjutnya enzim proteinase K diinaktifkan dengan mendidihkan selama 10 menit.

4.5. Primer untuk gen penyandi faktor virulensi

Amplifikasi PCR ditujukan untuk mengamplifikasi gen penyandi faktor virulensi *Staphylococcus aureus* yaitu gen penyandi protein A.

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi protein A adalah spa-1 : CAC CTG CTG CAA AT CTG CG dan spa-2 : GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC dengan program thermocycler 30 kali (94° C , 1 menit, 58° C , 1 menit dan 72° C, 1 menit), (Akineden *et al.*, 2001).

4.6. Prosedur Amplifikasi PCR (Akineden et al., 2001).

1. Reagen untuk PCR terdiri dari 1 μ l primer 1 dan 1 μ l primer 2, 0,6 μ l DNTPs, 3 μ l 10x buffer, 1,8 μ l Mg Cl₂, 0,1 μ l Taq polymerase dan 20 μ l air suling steril disiapkan dalam tabung microfuge 0,5 ml.
2. 2,5 μ l preparat DNA ditambahkan ke dalam tabung microfuge tersebut.
3. Selanjutnya di masukkan program *thermocycler*.
4. Siklus untuk program *thermocycler* adalah sebagai berikut : untuk Amplifikasi gen penyandi protein A (94⁰C untuk denaturasi selama 1 menit, annealing pada 58⁰C selama 1 menit dan ekstensi pada 72⁰C selama 1 menit) sebanyak 30 kali.

4.7. Prosedur Elektroforesis gel agar (Akineden et al., 2001).

1. Agarore gel 2% dalam 1 x TAE buffer disiapkan.
2. Hasil dari produk PCR sebanyak 12 μ l dicampur dengan loading buffer.
3. Cairan tersebut dimasukkan ke dalam sumuran agarore gel.
4. 100 bp *ladder* digunakan sebagai marker.
5. Proses elektroforesis dihentikan jika loading buffer sudah bermigrasi paling tidak 8 cm.
6. Diwarnai dengan ethidium bromide.
7. Visualisasi fragment DNA yang terbentuk dengan menggunakan UV transilluminator.

4.8. Analisis Protein dengan SDS-PAGE

Analisis protein dilakukan dengan tehnik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separatin gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris H Cl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%) dan *stacking gel* 12% (0,66 ml acrylamide; 0,8 ml Tris H Cl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4µl Temed dan 20 µl APS 10%). Plate berisi gel kemudian dipasang pada Minigel twin G 42 slab dan dituangkan electrophorsis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 µl sampel berupa *Staphylococcus aureus* yang telah didenaturasi dengan *Lamlli buffer* pada pemanasan 100 C selama 5 menit, dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5 – 200 kDa produksi Bio Rad. Elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel melewati *stacking gel* sekitar 1 jam.

Pencucian terhadap gel hasil running dilakukan 3 tahap, masing-masing menggunakan metanol 50% dan asam asetat 7,5% selama 30 menit, metanol 5% dan asam asetat 7,5% selama 20 menit dan glutaraldehyde 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan pewarnaan silver selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37% dalam aquadest 200 ml) dan dilakukan pencucian kembali

selama 2 kali 2 menit. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10%.

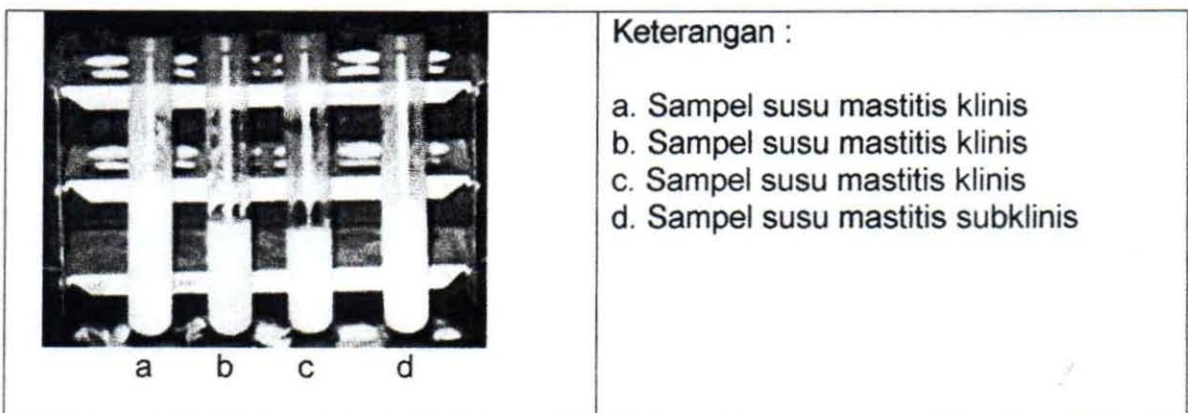
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

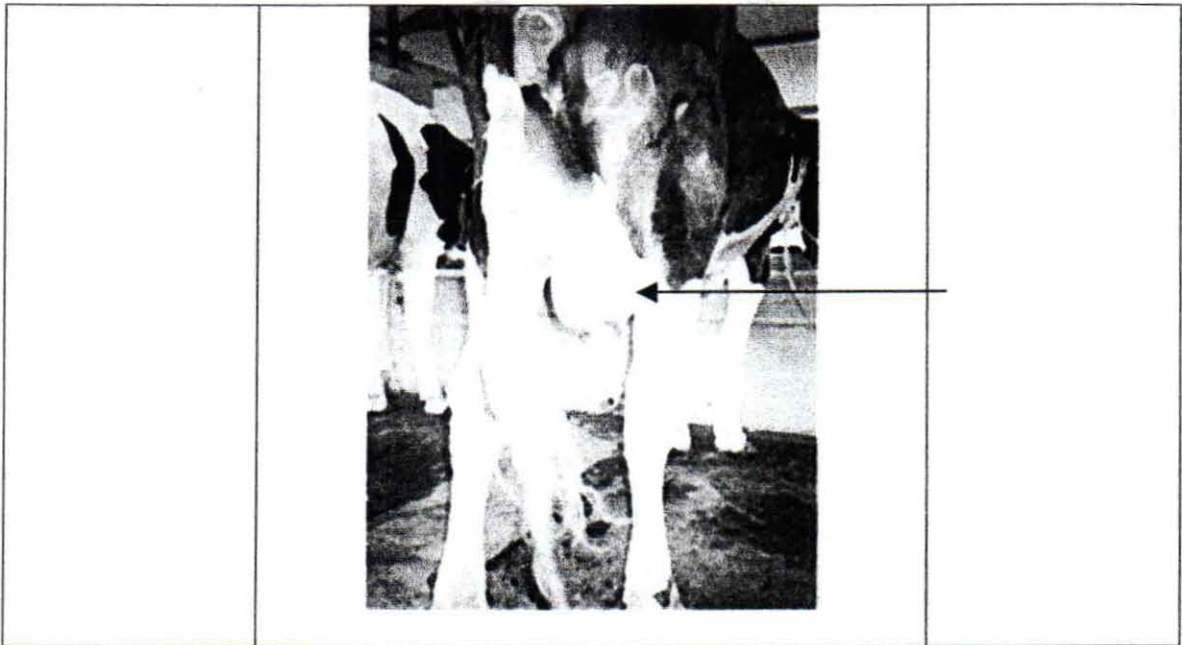
Penelitian ini bersifat survey observasional dengan tujuan untuk mengetahui prevalensi mastitis di peternakan sapi perah Nongkojajar. Selanjutnya dari sampel susu mastitis tersebut diisolasi isolat *Staphylococcus aureus* dengan maksud untuk diteliti tentang beberapa protein yang berperan sebagai faktor virulensi dari *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk lebih memahami proses patogenesis *Staphylococcus aureus* pada kasus mastitis sapi perah.

5.1. Prevalensi Mastitis Sapi Perah

Berdasarkan pada visualisasi dan palpasi untuk kasus mastitis klinis serta dengan alat deteksi CMT pada kasus mastitis subklinis, didapatkan data seperti pada gambar 5.1 dan gambar 5. 2, serta tabel 5.1.



Gambar 5.1. Susu yang diambil dari sapi penderita mastitis klinis dan subklinis



Gambar 5.2. Sapi penderita mastitis klinis

Tabel 5.1. : Prevalensi Mastitis pada Sapi Perah di Empat Peternakan sapi perah

Nama Peternakan sapi perah	Sampel sapi	Mastitis klinis	Mastitis subklinis	Normal
Nongkojajar	98	5 (5,1%)	76 (77,6%)	17 (17,3%)

Dari tabel di atas didapatkan data prevalensi mastitis sapi perah dari peternakan sapi perah Nongkojajar dengan angka prevalensi 82,7%.

Tingginya angka prevalensi mastitis ini disebabkan oleh sangat jeleknya sistem pembuangan kotoran peternakan sapi perah di daerah penelitian. Sanitasi yang jelek merupakan salah satu reservoir penting untuk kasus mastitis. Merujuk Smith and Hogan (1999) mengatakan bahwa reservoir penting untuk mastitis lingkungan adalah lingkungan sapi perah. Faktor dalam lingkungan mengkontaminasi ujung puting yang merupakan jalan utama dari bakteri patogen yang mencemari lingkungan untuk menimbulkan mastitis.

Sumber patogen dari lingkungan termasuk kotoran sapi, tempat makan dan minum sapi serta material untuk selimut tidur sapi. Selimut tidur sapi

merupakan sumber patogen lingkungan dalam peternakan sapi perah yang memacu terjadinya mastitis jika ujung puting sapi sering dan lama kontak dengannya. Streptococci dan coliform bakteri yang merupakan patogen lingkungan dapat hidup dan berkembang dalam selimut tidur dari bahan organik. Jerami yang digunakan sebagai selimut tidur dapat mendukung pertumbuhan *Streptococcus uberis*, sementara bahan gergajian kayu dan kotoran yang didaur ulang umumnya meningkatkan jumlah *E. coli* dan *Klebsiella spp.* (Schrick et al., 2001). Salah satu alternatif untuk mengendalikan mastitis yang disebabkan patogen lingkungan adalah penggunaan selimut dari bahan inorganik seperti pasir atau tumbukan batu kapur yang terbukti menghambat pertumbuhan patogen lingkungan.

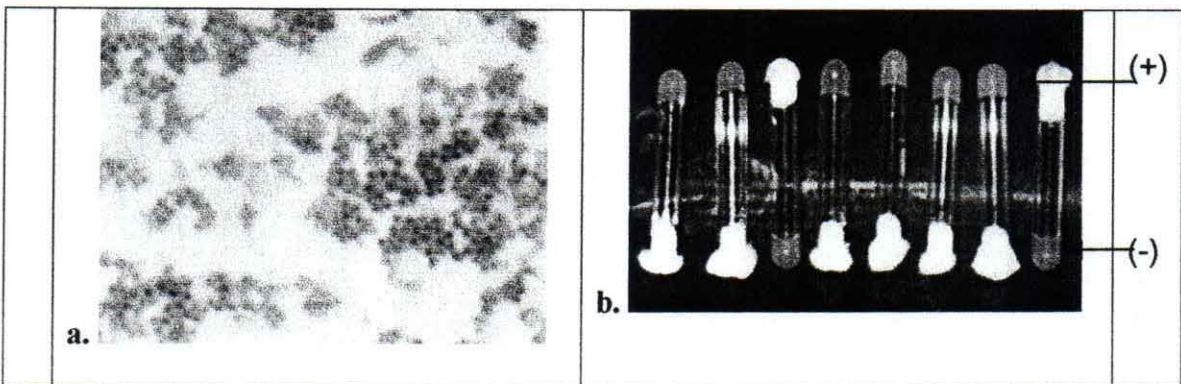
Faktor lain untuk tingginya angka prevalesi mastitis adalah patogen kontagiosa. Patogen kontagiosa yang sering menyebabkan mastitis pada sapi perah adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* dan *Corynebacterium bovis* (Fox, 2000) Secara ekonomis yang paling merugikan berperan besar dalam menyebabkan mastitis adalah *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae*.

Semua patogen kontagiosa mempunyai karakteristik umum yang menjadi sumber utama mikroorganisme untuk meninfeksi kelenjar susu adalah kelenjar susu yang sudah terinfeksi yang berada di peternakan tersebut. Penyebaran patogen kontagiosa utamanya pada saat pemerahan dengan bantuan alat pemerahan termasuk mesin pemerahan, tangan pemerah, handuk untuk membersihkan ambing. *Streptococcus agalactiae* merupakan parasit obligat di

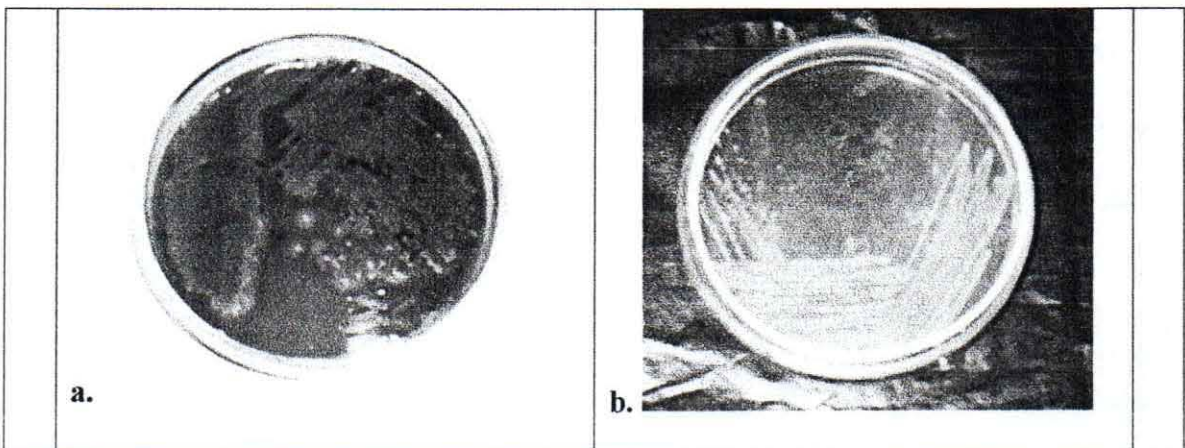
ambing sapi perah dan tidak ditemukan hidup bebas di lingkungan (Waage et al., 2001). Sapi dara yang dimasukkan dalam peternakan pertama kali dapat terinfeksi dengan *Streptococcus agalactiae* dan infeksi umumnya dihasilkan dari menyusui susu yang terinfeksi patogen (Waage et al., 2001).

5.2. Identifikasi Isolat *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan pada uji mikroskopis dan pewarnaan Gram (gambar 5.3.), uji katalase, kemampuan fermentasi MSA (gambar 5.4.), bentuk hemolisis β (gambar 5.4.) dan uji koagulase (gambar 5.5), maka isolat *Staphylococcus aureus* yang berhasil diperoleh seperti tabel 5.2.



Gambar 5.3. a. Mikroskopis kokus dengan pewarnaan Gram +, b. Hasil uji koagulase



Gambar 5.4. a. Hasil uji hemolisis β , b. Hasil uji fermentasi pada MSA

Hasil isolasi *Staphylococcus aureus* ini didasarkan atas rujukan yang didiskripsikan oleh Mylotte (2003) seperti tabel 5.2.

Tabel 5.2. Differensiasi *Staphylococci*

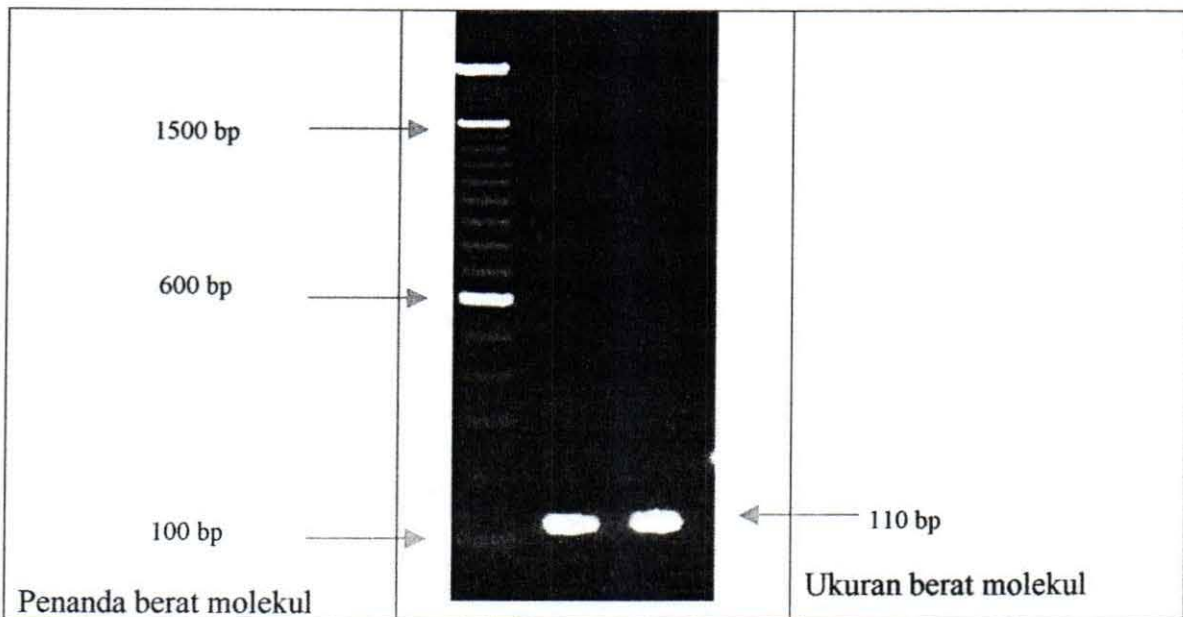
Test	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Katalase	+	+	+
Fermentasi MSA	+	+	-
Gram	+	+	+
Hemolisis β	+	-	-
Koagulase	+	-	-

Sebuah identifikasi yang cepat dan terpercaya untuk *S. aureus* yang diambil dari sampel susu merupakan hal utama dalam pengontrolan terhadap *Staphylococcal mastitis*. Tingginya angka sensitivitas dan spesifisitas dari uji koagulase yang dibuat untuk metode standard dalam identifikasi *S. aureus* dalam susu. Hanya separuh dari isolat *S. aureus* yang positif dalam uji koagulase setelah 4 jam waktu inkubasi, dan waktu inkubasi lebih dari 12 jam diperlukan untuk memperoleh hasil yang terpercaya (Boerlin *et al.*, 2003). Uji β hemolisis juga merupakan kriteria yang penting untuk identifikasi *Staphylococcus aureus* dari kultur primer. Meskipun dalam studi sebelumnya diperlihatkan data sekitar seperlima dari isolat *S. aureus* tidak menunjukkan aktivitas β hemolisis pada kultur primernya. Jadi uji β hemolisis merupakan uji yang spesifik tetapi kurang sensitif untuk identifikasi *S. aureus*. Untuk menghasilkan identifikasi *S. aureus* yang cepat dan terpercaya perlu mengkombinasikan antara uji β hemolisis dengan uji koagulase dengan waktu inkubasi 4 jam (Boerlin *et al.*, 2003).

5.3. Identifikasi Gen Penyandi Protein A

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi protein A adalah spa-1 : CAC CTG CTG CAA AT CTG CG dan spa-2 : GGC TTG TTG TCT TCC TC dengan program thermocycler 30 kali (94⁰C , 1 menit, 58⁰C , 1 menit dan 72⁰C, 1 menit), (Akineden *et al* 2001) (tabel 2).

Hasilnya seperti gambar



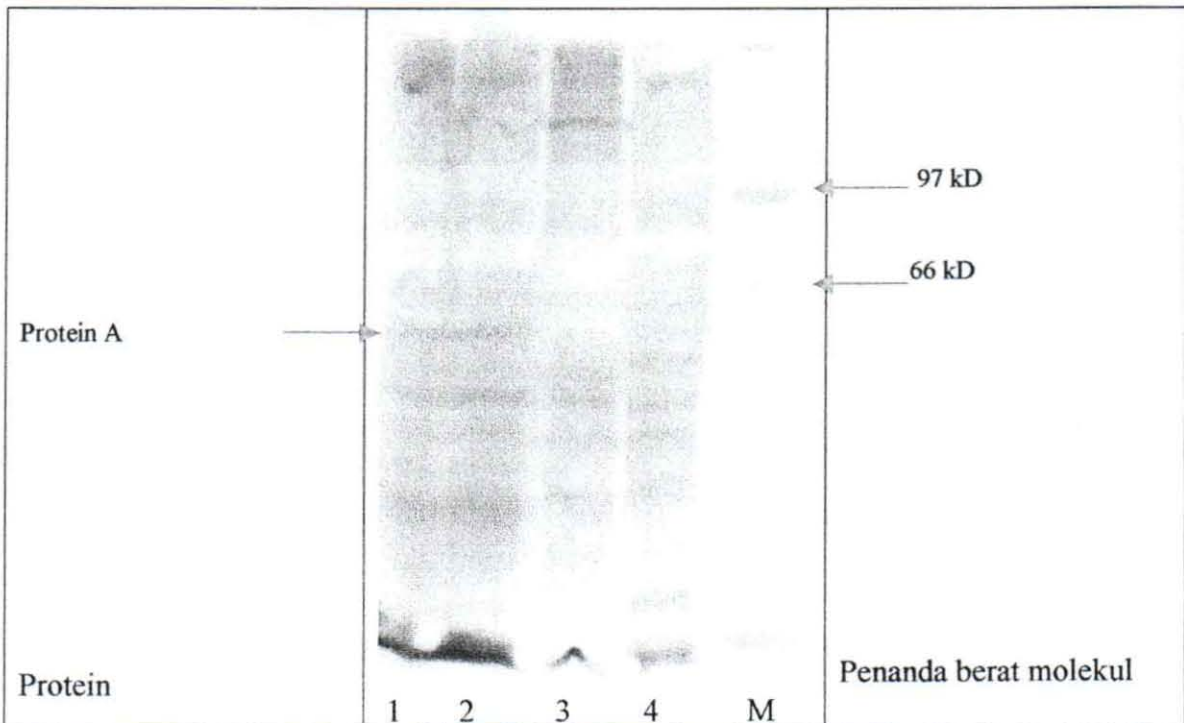
Gambar 5.5. Gen Penyandi Protein A dengan BM 110 bp

Penulis menemukan bahwa gen penyandi protein A juga merupakan pilihan yang baik untuk dapat mengidentifikasi serta membedakan varibilitas strain *Staphylococcus aureus* (Kuzma *et al*, 2005). Amplifikasi dari gen penyandi protein A menghasilkan 2 tipe gen penyandi dengan BM 110 bp dan 220 bp. Hasil amplifikasi ini merupakan polimorfisme gen penyandi protein A yang merujuk penelitian Akineden *et al* (2001) terdiri dari 90 bp, 110 bp, 140 bp, 170 bp, 190 bp, 200 bp, 240 bp, 270 bp, 290 bp dan 320 bp. Kuzma *et al* (2005) menerangkan bahwa gen penyandi protein A terdiri dari beberapa fungsi yang

berbeda yang dibutuhkan untuk perlekatan pada dinding sel hospes. Beberapa fungsi terdiri dari *Fc binding region*, *X region* dan *C terminus*. Gen penyandi protein A dengan BM 110 bp dan 220 bp merupakan gen penyandi protein A dari *X region*.

5.4. Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein A

Pada penelitian ini, penulis mengkarakterisasi protein yang berperan dalam faktor virulensi *Staphylococcus aureus* yaitu protein dengan berat molekul 55 kD. Protein dengan berat molekul BM 55 kD berupa protein A (*spa*).



Gambar 5.6. Ekspresi Gen Penyandi Protein A dengan BM 55 kD

Keterangan : lajur 1 dan 2 isolat *S. aureus*, lajur 3 isolat *S. saprophyticus*, lajur 4 isolat *S. epidermidis* dan lajur M adalah penanda berat molekul.

Eksresi protein spa dengan BM 55 kD diregulasi oleh agr dan sar dan jumlah menurun pada phase pertumbuhan stasioner. Protein spa diekspresikan oleh kebanyakan Adhesin Staphylococci yang termasuk famili MSCRAMM.

Eksresi protein spa dengan BM 55 kD diregulasi oleh agr dan sar dan jumlah menurun pada phase pertumbuhan stasioner. Protein spa diekspresikan oleh kebanyakan Adhesin Staphylococci yang termasuk famili MSCRAMMs. Protein spa diekspresikan selama fase pertumbuhan eksponensial dan ditranskripsikan menurun dalam regulasi selama fase pertumbuhan post eksponensial (Gao and Stewart, 2004). Proses ini melibatkan sistem *accessory gene regulator (Agr)* dan sistem *quorum sensing global regulatory* dari *S. aureus*.

Protein spa mengikat Fc region dari immunoglobulin dari kebanyakan mamalia (Harteib *et al*, 2000). Fungsi protein spa yang mengikat Fc region merupakan kontributor dalam faktor virulensi dari bakteri tersebut karena berkompetisi dengan sel pagosit dalam penyediaan tempat IgG-Fc yang mengakibatkan hilangnya kemampuan opsonisasi (Patti *et al.*, 1994). Dalam fungsi mengikat immunoglobulin, protein spa tampak mengaktifkan complement juga merupakan faktor virulensi dari *Staphylococcus aureus* (Callegan *et al.*, 1994).

Pada penyakit mastitis yang disebabkan *S. aureus*, patogenesis adalah multifaktorial dan sampai saat ini kurang dimengerti. Sifat pathogenesis dari *S. aureus* tergantung dari dua hal penting yaitu faktor virulensi dan sifat host (Cunningham *et al*, 1996). Pathogenesitas dari *S. aureus* adalah kemampuan untuk menyebabkan penyakit dalam host, sedangkan faktor virulensi adalah

produksi dari kuman yang dapat menyebabkan infeksi dan meningkatkan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit (Cunningham *et al*, 1996).

Faktor virulensi termasuk di dalamnya adalah faktor permukaan kuman (protein, dinding sel peptidoglycan, kapsul polysakarida, protein A); enzim *hydrolytic (nucleases, hyaluronidase, proteases dan collagenase)*, fungsi utama adalah merubah jaringan lokal menjadi nutrisi untuk kebutuhan kuman; faktor biokimia yang dapat meningkatkan kemampuan intraseluler (carotenoids, produksi catalase); resistensi terhadap antibiotika (*β -lactamases dan penicillin binding proteins*).

Faktor permukaan merupakan hal utama dari *S. aureus* sebagai bahan mempromosi kolonisasi ke jaringan host, hal ini didasarkan bahwa bahan ini diekspresikan pertama kali pada saat phase pertumbuhan eksponensial (Lowy, 1998). Beberapa protein permukaan menampilkan sifat *adhesive* yang disebabkan *ligand-binding domains* seperti protein A, yang mempunyai sifat anti-phagocytic yang didasarkan atas kemampuan untuk mengikat Ig G dan leukosit *polymorphonuclear* pada regio Fc. Secara structural dan fungsional protein ini termasuk MSCRAMM yang termasuk di dalamnya adalah fibronectin dan collagen-binding protein (Foster & MCDevitt, 1994), dan juga clumping faktor yang merupakan protein berfungsi mengikat fibrin dan mempromosi terbentuknya gumpalan darah pada jaringan traumatik (Todar, 2002).

Setelah terjadi kolonisasi, *S. aureus* menginvasi jaringan yang dimediasi oleh beberapa bahan ekstra seluler dan *cell-associated proteins*, termasuk α -toxins dan haemolysins (β , χ , δ) yang menyebabkan haemolysis eritrosit dan

leukosit dan bersama dengan leukocidin dan leukotoxin yang berakibat terjadinya abses dan septic shock. Pathogenesis dari kondisi ini disebabkan oleh kemampuan toksin untuk menghancurkan sel eukaryotik. Pada epithelium pulmonary, pembengkakan osmotic menyebabkan pecahnya integritas sel dengan efek meningkatkan *vascular permeability*. Efek pada host adalah *pulmonary oedema* atau *respiratory stress syndrome* pada orang dewasa. Produksi dari *haemolytic pore-forming & pro-inflammatory toxins*, *pyrogenic-toxins* atau *exfoliative toxins* memudahkan *S. aureus* untuk menyebar ke jaringan sekitarnya dan cenderung diproduksi selama *phase stationary* dari infeksi (Dinges, 2000, Lowy, 1998).

Potensi infeksi *S. aureus* dapat dikaitkan pada koordinasi regulasi temporal dari faktor virulensi. Pada awal infeksi *S. aureus*, faktor virulensi diekspresikan untuk adhesi pada sel host dan terjadi kolonisasi seperti *collagen*, *fibronectin adhesins* dan *protein A*. Pada saat jumlah bakteri di jaringan terinfeksi tinggi, ekspresi protein permukaan ditekan dan ekspresi exoprotein ditingkatkan. Hal ini terkait dengan regulasi gen-gen yang mengkoordinasi beberapa kelompok gen dan disebut *global regulatory genes*. Karakterisasi utamanya adalah oleh dua *pleiotropically acting regulatory* yaitu *agr* (*accessory gene regulator*) dan *Sar* (*staphylococcal accessory gene regulator*). Operon *agr* menyandi produksi beberapa protein yang berperan dalam signal *transduction pathway* yang menghasilkan peningkatan regulasi dari gen exoprotein dan penurunan dari gen protein permukaan (Rechlin, 1999).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian secara keseluruhan dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai hal berikut :

1. Identifikasi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar dengan berat molekul 110 bp
2. Karakterisasi ekspresi gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di peternakan sapi perah Nongkojajar dengan berat molekul 55 kD.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disampaikan beberapa saran sebagai berikut :

1. Melanjutkan pencarian perbedaan ekspresi protein dengan dengan jalan peningkatan BM protein sampai Mega Dalton
2. Perlunya dipurifikasikannya protein A *Staphylococcus aureus* sebagai kandidat vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Akineden, O., C. Annemuller, A.A. Hassan, C. Laemler, W. Wolter and M. Zschok. 2001. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk Cows with Mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8, 959 – 964.
- Anonimous. 2003. Mastitis in Dairy Cows. Departement of Animal Science, Faculty of Agricultural & Environmental Sciences, Macdonald Campus of McGill University
- Bhakdi, S and J. Tranum-Jensen. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*. 55, 733 – 751
- Booth, M.C., A.L. Cheung and M.S. Gilmore. 1997. Staphylococcal accessory regulator (sar) in Conjunction with agr Contributes to *Staphylococcus aureus* Virulence in Endophthalmitis. *Infect Immun*. 65, 1550 – 1556
- Chan, P.F. and S.J. Foster. 1998. The Role of Environmental Factors in the Regulation of Virulence Determinant Expression in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144, 2469 – 2479.
- Coleman, G., M. Aboshkiwa and B. Al-ani. 1989. The Effect of Glucose on the Expression of Extracellular protein genes by *Staphylococcus aureus* strain V8. *FEMS Microbiol Lett*. 52, 247 – 250.
- Coulter, S.N., W.R. Schan and C.K. Stover. 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting Growth and Survival in Multiple Infection Environments. *Mol Microbiol*. 30, 393 – 404.
- Cunningham, R., A. Cockayne and H. Humphreys. 1996. Clinical and Molecular Aspects of the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J. Med. Microbiol*. 44, 157 – 164.
- Deora, R., T. Tseng and T.K. Misra. 1997. Alternative Transcription Factor σ B of *Staphylococcus aureus* : Characterization and Role in Transcription of the Global regulatory Locus sar. *J. Bacteriol*. 179, 6355 – 6359.
- Dinges, M.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13, 16 – 34.
- Foster, T.J. and D. Mc Devitt. 1994. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol. Lett*. 118, 199 – 205.

Gillaspy, A.F., J.M. Patti and M.S. Smeltzer. 1997. Transcriptional Regulation of the *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesion Gene. *Infect. Immun.* 65, 1536 – 1540.

Hurley, W.L and D.E. Morin. 2003. Mastitis Lesson A. University of Illinois, USA.

Heinz, S.A., T. Schennings, A., Heimdahl and J.I. Flock. 1996. Collagen Binding of *Staphylococcus aureus* is a Virulence Factor in Experimental Endocarditis. *J Infect Dis.* 174, 83 – 88.

Iandolo, J.J. 1989. Genetic Analysis of Extracellular Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 43, 375 – 402.

Jones, G.M. 1998. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. Virginia Cooperative Extension, USA.

Lee, J.C., J.S. Park, S.E. Shepherd, V. Carey and A. Fatton. 1997. Protective Efficacy of Antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 Kapsul polisakarida in a Modified Model of Endocarditis in Rats. *Infect Immun.* 65, 4146 – 4151.

Lina, G., S. Jarraud, T. Greenland, A. Pedraza and F. Vandenesch. 1998. Transmembrane Topology and Histidine Protein Kinase Activity of Agr C, the agr Signal Receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 28, 655 – 662.

Lowe, A.M., D.T. Beattie and R.L. Deresiewicz. 1998. Identification of Novel Staphylococcal Virulence genes by in vivo Expression Technology. *Mol Microbiol.* 27, 967 – 976.

Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infection. *England Journal of Medicine.* 339, 520 – 532.

Moreillon, P., J.M. Entenza, P. Francioli and T.J. Foster. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. *Infect Immun.* 63, 4738 – 4743.

Morfeltdt, E., D. Taylor, A. Von Gabain and S. Arvidson. 1996. Detection of the Response Regulator Agr A in the Cytolytic Fraction of *Staphylococcus aureus* by Monoclonal Antibodies. *FEMS Microbiol Lett.* 143, 195 – 201.

Morin, D.E. and W.L. Hurley. 2003. Mastitis Lesson B. University of Illinois, USA.

Nilsson, I.M., J.C. Lee, T. Bremell, C. Ryden and A. Tarkowski. 1997. The Role of Staphylococcal Polysaccharide Microcapsule Expression in Septicemia and Septic Arthritis. *Infect Immun.* 65, 4216 – 4221.

- Novick, R., H. Ross, S. Projan and S. Moghazeh. 2000. Activation and Inhibition of the Staphylococcal Agr System. *Science* 391, 390 – 393.
- Ohlsen, K., K.P. Koller and J. Hacker. 1997. Analysis of Expression of the alpha-toxin Gene of *Staphylococcus aureus* by Using a Chromosomally encoded hla::lacZ Gene Fusion. *Infect Immun.* 65, 3606 – 3614.
- Palma, M., S. Nozohoor, T. Schennings, A. Heimdahl and J.I. Flock. 1996. Lack of the Extracellular 19 kD. Fibrinogen-binding Protein from *Staphylococcus aureus* Decreases Virulence in Experimental Wound Infection. *Infect Immun* 64, 5284 – 5289.
- Patti, J.M., T. Bremel, A. Abdelnour, C. Ryden and M. Hook. 1994. The *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesin is a virulence Determinant in Experimental Septic Arthritis. *Infect Immun.* 62, 152 - 161.
- Rechtin, T.M. 1999. Characterisation of the Sar A. Virulence Gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 33, 307 – 316.
- Regassa, L.B., and M.J. Betley. 1993. High Sodium Chloride Concentration Inhibit Staphylococcal Enterotoxin C Gene Expression at the Level of sec mRNA. *Infect Immun.* 61, 1581 – 1585.
- Roberson, J.R., L.K. Fox and T.E. Besser. 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from variuos sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354 –3356.
- Scheenings, T., A. Heimdahl, K. Coster and J.I. Flock. 1993. Immunization with Fibrinogen Binding Protein From *Staphylococcus aureus* Protect Against Experimental Endocarditis in Rats. *Microb Patho.* 15, 227 – 236.
- Sheagren, J.N. 1984. *Staphylococcus aureus* : The Persistent Pathogen. *The New England Journal of Medicine.* 310, 1368 – 1373.
- Sudarwanto, M. 1999. Usaha Peningkatan Produksi Susu Melalui Program Pengendalian Mastitis Subklinis. Prosiding Seminar Nasional Mastitis, Bogor.
- Todar, K. 2002. *Staphylococcus aureus*. University of Wisconsin, Dept of Bacteriology, Lecture Notes.
- Wann, E.R., S. Gurusiddappa and M. Hook. 2000. The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun.* 64, 3142 – 3147.
- Wisell, K.T. 2000. Regulation of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. Thesis, Karolinska University Press, Stockholm.

Lampiran 1 : DAFTAR SINGKATAN

Agr	acesory gene regulator
AIP	auto inducing peptide
BM	berat molekul
CMT	California Mastitis Test
ClfA gene	clumping factor A gene
CNS	Coagulase Negative Staphylococci
Coa gene	coagulase gene
ET	epidermolytic toxin
ECM	extra celuller matrix
IVET	in vivo expression technology
IMI	Intrmammary Infection
IL	interleukin
MSA	Manitol Salt Agar
MSCRAMM	microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
ORF	Open Reading Frame
RNA III	ribo nucleic acid III
PBP	Penicillin Binding Protein
Sar	staphylococcal acesory gene regulator
SCC	somatic cell count
SE	staphylococcal enterotoxin
spa gene	surface protein A gene
STM	signature tagged mutagenesis
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal Chromosome Cassette <i>mec</i>
TSS	toxic shock syndrome
TSST	toxic shock syndrome toxin
TNF	Tumor Necrotic Factor

Lampiran 2 : Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus* berupa adhesin (Pei, 2001)

Table 2. defined and potential virulence factors of *S. aureus*

A. adhesins

Gene	defined or potential virulence	Ligands / functions	Reference
<i>clfA</i>	clumping factor A (ClfA)	Fg (C-terminal of γ -chains), calcium, platelets	[McDevitt <i>et al.</i> 1994; Hartford <i>et al.</i> 2001; Siboo <i>et al.</i> 2001]
<i>clfB</i>	clumping factor B (ClfB)	Fg (α -, β -chains)	[Ni Eidhin <i>et al.</i> 1998]
<i>sdrC</i>	SdrC	unknown	[Josefsson <i>et al.</i> 1998]
<i>sdrD</i>	SdrD	calcium	[Josefsson <i>et al.</i> 1998]
<i>sdrE/bbp</i>	SdrE: Bbp bone sialoprotein - binding protein	bone sialoprotein	[Josefsson <i>et al.</i> 1998; Tung <i>et al.</i> 2000]
<i>pls</i>	plasmin sensitive protein (Pls)	reduce adherence	[Savolainen <i>et al.</i> 2001]
<i>fnA, fnB</i>	FnBP-A, FnBP-B	Fn, Fg (γ -chains) $\alpha 5 \beta 1$ (epithelial cells)	[Jonsson <i>et al.</i> 1991; Miyamoto <i>et al.</i> 2001]
<i>cna</i>	collagen-binding protein (Cna)	collagen	[Patti <i>et al.</i> 1992; Patti <i>et al.</i> 1994]
<i>spt</i>	staphylococcal protein A	IgG (Fc fragment), vWF	[Uhlen <i>et al.</i> 1984a; Uhlen <i>et al.</i> 1984b; Hartleb <i>et al.</i> 2000]
<i>cbps</i>	elastin-binding protein	elastin	[Park <i>et al.</i> 1991; Park <i>et al.</i> 1996; Park <i>et al.</i> 1999]
<i>fbp</i>	fibrinogen-binding protein (FbpA)	Fg	[Cheung <i>et al.</i> 1995]
	major histocompatibility complex class II analogous protein (Map)	Fg, Fn, bone sialoprotein, Vn, thrombospondin, prothrombin, internalization	[McGavin <i>et al.</i> 1993]
	extracellular adherence protein (Eap)		[Palma <i>et al.</i> 1999]
<i>vWp</i>	vWF-binding protein (vWbp)	vWF	[Ahlen <i>et al.</i> 2001]
<i>efb</i>	extracellular fibrinogen-binding protein (Efb)	Fg (α -chains)	[Boden & Flock 1992; Palma <i>et al.</i> 1998]
<i>cox</i>	Coagulase	Fg, prothrombin	[Boden & Flock 1989; Boden & Flock 1992]
	thrombospondin-binding protein	thrombospondin	[Herrmann <i>et al.</i> 1991]
	laminin-binding protein	laminin	[Lopes <i>et al.</i> 1985]
<i>icaADBC</i>	intercellular adhesin poly-N-succinyl-beta-1,6-glucosamine	biofilm formation	[Cramton <i>et al.</i> 1999; Cramton <i>et al.</i> 2001]
<i>sbi</i>	Sbi	IgG, apolipoprotein	[Zhang <i>et al.</i> 1998; Zhang <i>et al.</i> 1999; Zhang <i>et al.</i> 2000]

Lampiran 3 : Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus* yang berupa toksin dan Invasin (Pei, 2001)

B. Toxins [Projan & Novick 1997; Dinges *et al.* 2000; Kuroda *et al.* 2001]

Pathogenicity islands	Gene	Toxins	Related diseases/ functions
toxic shock syndrome	<i>tst</i>	TSST-1	toxic shock syndrome superantigen (bind to V β -chain of TCR)
exotoxin	<i>set1-5</i> <i>set6-15</i> <i>lpl1-9</i>	staphylococcal exotoxin-like proteins probable lipoproteins	susperantigens induce proinflammatory cytokine production
enterotoxin	<i>egc, sca, sep, seo, sem, sei, sek, seg, splA-F, lukD, lukE</i>	enterotoxins A-E secretory serine protease leukotoxins	superantigens, food poison toxic shock syndrome unrelated to menstruation destroy white blood cells

C. Invasins [Projan & Novick 1997; Dinges *et al.* 2000; Kuroda *et al.* 2001]

Gene	Virulence factors	Functions
<i>hla</i>	α -hemolysin	destroys blood and tissue cells
<i>hlb</i>	β -hemolysin	destroys blood cells
<i>hlgA, hlgC, hlgB</i>	γ -hemolysin	destroys blood cells
<i>hld</i>	δ -hemolysin	destroys blood and tissue cells
<i>plc</i>	phospholipase C	hydrolyzes phosphatidylinositol
<i>geh</i>	lipase	degrades lipids
<i>sak</i>	staphylokinase	nonphysiological activator of fibrinolysis (activating plasminogen)
<i>eta, etb</i>	exfoliative toxin A, B	destroys tissue, relative to SSSS (staphylococcal scalded skin syndrome)
<i>xspA, xspB</i>	proteases	destroys tissue
<i>nuc</i>	thermonuclease	degrades nucleic acid