

SKRIPSI

**PROFIL FRAKSI PROTEIN *Staphylococcus aureus* DARI SUSU
YANG SENSITIF TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA**



Oleh :

RIANTI MARIANI
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**PROFIL FRAKSI PROTEIN *Staphylococcus aureus* DARI SUSU
YANG SENSITIF TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

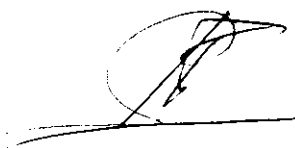
Oleh

RIANTI MARIANI

069912641

Menyetujui

Komisi Pembimbing



Dadik Raharjo, M.Kes.,Drh
Pembimbing Pertama

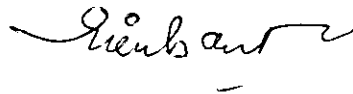


Retno Bijanti, M.S.,Drh
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**.

Menyetujui

Panitia Penguji



Soetji Prawesthirini, S.U.,Drh

Ketua



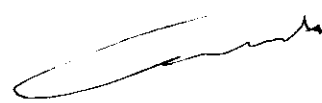
Didik Handijatno, M.S.,Drh

Sekretaris



Dadik Raharjo, M.Kes.,Drh

Anggota



Sri Chusniati, M.Si.,Drh

Anggota



Retno Bijanti, M.S.,Drh

Anggota

Surabaya, 21 April 2004

Fakultas Kedokteran Hewan



Prof. Dr. Ismudiono, M.S.,Drh

NIP 130687297

PROFIL FRAKSI PROTEIN *Staphylococcus aureus* DARI SUSU YANG SENSITIF TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA

Rianti Mariani

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gambaran fraksi protein dari *Staphylococcus aureus* yang dinyatakan dengan berat molekul. Fraksi protein tersebut nantinya dapat digunakan untuk penelitian lanjutan biologi molekuler sebagai bahan dasar pengembangan kiti pendeteksi residu antibiotika dengan metode cepat, sederhana dan murah maupun pengembangan pembuatan vaksin sub unit *Staphylococcus aureus* untuk penanganan mastitis sub klinis.

Staphylococcus aureus diisolasi dari susu segar yang didapatkan dari peternakan sapi perah di Surabaya dan dilakukan identifikasi. Kemudian dilakukan uji kepekaan terhadap beberapa antibiotika, antara lain; Penisilin G 10 IU, metisilin 5 µg, gentamisin 10 µg, eritromisin 15 µg, kloramfenikol 30 µg, dan tetrasiklin 30 µg untuk mendapatkan bakteri yang sensitif. *Staphylococcus aureus* yang sensitif dibiakkan pada media *Tryptic Soy Broth* selama 24 – 48 jam. Pemecahan bakteri dilakukan dengan *sentrifus* dan dilakukan *grinding* untuk pemecahan bakteri. Identifikasi protein dengan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polycrilamide Gels Electroforesis*) 10% menggunakan pewarnaan *Coomasie Brilliant Blue* untuk menggambarkan fraksi protein dari *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika berdasarkan berat molekul.

Hasil menunjukkan adanya 11 fraksi protein yang teridentifikasi pada sampel *Staphylococcus aureus* yaitu : 67 kDa, 55 kDa, 49 kDa, 45,5 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 11,4 kDa dan 5,3 kDa. Dari protein tersebut ada protein spesifik yang dimiliki oleh *Staphylococcus aureus* yaitu : Protein A dengan berat molekul 42 kDa, Enterotoksin dengan berat molekul 31 dan 35 kDa dan Beta laktamase dengan berat molekul 28 kDa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Penulisan yang berjudul “Profil Fraksi Protein *Staphylococcus aureus* dari Susu yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika” penulis mencoba mengidentifikasi fraksi protein dari *Staphylococcus aureus* berdasarkan berat molekul dengan menggunakan SDS-PAGE 10%. Tujuan penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu dan teknologi.

Keberhasilan penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung, oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi atas pemberian dana Due-Like Batch III di Universitas Airlangga.
2. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas segala fasilitas yang diberikan.
3. Bapak Dadik Raharjo, M.Kes., Drh, selaku Dosen Pembimbing Pertama atas arahan, bimbingan dan bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.

4. Ibu Retno Bijanti, M.S., Drh, selaku Dosen Pembimbing Kedua atas segala bimbingan, dukungan, nasehat dan saran selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Bapak Benjamin CHR Tehupuring, M.Si., Drh, selaku Dosen Ketua Penelitian di Research Grant Due-Like Batch III atas segala arahan, dukungan dan bimbingan selama penelitian berlangsung.
6. Ibu Soetji Prawesthirini, SU, Drh, selaku Kepala Laboratorium VPH (Veterinary Public Health) Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas segala fasilitas yang diberikan kepada penulis selama penelitian berlangsung.
7. Direktur Tropical Disease Centre Universitas Airlangga beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang telah diberikan selama penelitian berlangsung.
8. Bapak Dr. dr. Eddy Bagoes Wasito. Sp. MK., selaku Kepala Laboratorium Gastroenteritis Tropical Disease Centre beserta staf atas segala fasilitas dan bimbingan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
9. Ayah, Ibu penulis dan Mas Fani atas segala dukungan, kepercayaan, kesabaran dan doa yang selalu dipanjatkan untuk penulis.
10. Teman penelitian, Jeki dan Nani, terima kasih atas kerjasamanya yang baik, saling membantu dan saling memberi semangat. Teman-teman FKH '99, Liizza, Nuria, Niken, Mimien, Nina, Lisa, dan Wisnu atas segala dukungan, kebaikan dan waktu yang selama ini diberikan.
11. Seluruh pihak yang tidak dapat disebut satu persatu yang telah membantu demi penyempurnaan tulisan ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan karya tulis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan masukan yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Penulis berharap agar penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu dan teknologi, dan semoga Allah SWT meridhoi dan menerima amal ibadah penulis.

Surabaya, Maret 2004

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Landasan Teori.....	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1.1 Taksonomi.....	8
2.1.2 Sifat – sifat <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1.2.1 Morfologi dan Pewarnaan.....	8
2.1.2.2 Sifat Pupukan dan Biokimia.....	9
2.1.2.3 Daya Tahan Kuman Terhadap Perlakuan Fisik dan Kimia.....	10

2.1.2.4	Struktur Antigen, Toksin dan Enzim.....	10
2.1.2.5	Resistensi.....	11
2.1.2.6	Patogenitas.....	12
2.1.3	Pengobatan.....	13
2.2	Penisilin G.....	14
2.2.1	Asal dan Kimia.....	14
2.2.2	Aktivitas Antibiotika.....	14
2.3	Metisilin.....	15
2.4.1	Asal dan Kimia.....	15
2.4.2	Aktivitas Antibiotika.....	15
2.4	Gentamisin.....	16
2.3.1	Asal dan Kimia.....	16
2.3.2	Aktivitas Antibiotika.....	16
2.5	Eritromisin.....	17
2.5.1	Asal dan Kimia.....	17
2.5.2	Aktivitas Antibiotika.....	17
2.6	Kloramfenikol.....	19
2.6.1	Asal dan Kimia.....	19
2.6.2	Aktivitas Antibiotika.....	19
2.7	Tetrasiklin.....	20
2.7.1	Asal dan Kimia.....	20
2.7.2	Aktivitas Antibiotika.....	20

BAB III. MATERI DAN METODE.....	21
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.2 Langkah-langkah Penelitian.....	21
3.3 Jenis Penelitian.....	21
3.4 Bahan dan Materi Penelitian.....	22
3.4.1 Unit Analisis.....	22
3.4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	22
3.5 Metode Penelitian.....	23
3.5.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.5.2 <i>Screening</i> Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika menggunakan Metode Cakram Difusi.....	24
3.5.3 Pembiakan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika.....	25
3.5.4 Pemanenan, Pemecahan dan Pemisahan Protein Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika.....	25
3.5.5 Identifikasi Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polycrilamine Gels Elektrophoresis</i>).....	26
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	28
4.1 Hasil Uji Kepekaan <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Metode Cakram Difusi terhadap Beberapa Antibiotika.....	28
4.2 Hasil Fraksinasi Protein <i>Staphylococcus aureus</i> dengan menggunakan SDS PAGE 10%.....	29
BAB V. PEMBAHASAN.....	31
5.1 Uji Kepekaan <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Metode Cakram Difusi terhadap Beberapa Antibiotika.....	31

5.1 Fraksinasi Protein <i>Staphylococcus aureus</i> dengan menggunakan SDS PAGE 10%.....	32
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
6.1 Kesimpulan.....	34
6.2 Saran.....	34
RINGKASAN.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Zona Hambatan Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Standar <i>Kirby – Bauer</i>	25
2. Hasil Uji Kepekaan <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3. Hasil Isolasi, Identifikasi dan Uji Kepekaan <i>Staphylococcus aureus</i>	46
4. Penentuan Rf dan Berat Molekul Marker.....	51
5. Harga Rf dan Berat Molekul Sampel <i>Staphylococcus aureus</i>	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Kimia Penisilin G.....	14
2. Struktur Kimia Metisilin.....	15
3. Struktur Kimia Gentamisin.....	17
4. Struktur Kimia Eritromisin.....	18
5. Struktur Kimia Kloramfenikol.....	19
6. Struktur Kimia Tetrasiklin.....	20
7. Hasil Fraksinasi Protein <i>Staphylococcus aureus</i> menggunakan SDS PAGE 10%.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alur Penelitian.....	42
2. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	43
3. Hasil Isolasi, Identifikasi dan Uji Kepekaan <i>Staphylococcus aureus</i>	46
4. Komposisi Bahan – bahan yang digunakan dalam Penelitian.....	49
5. Perhitungan Fraksi Protein <i>Staphylococcus aureus</i> dengan menggunakan SDS PAGE 10%.....	51
6. Hubungan antara Rf (x) dengan Berat Molekul Protein Standar (y) pada Marker Protein <i>Staphylococcus aureus</i> (SDS PAGE 10%).....	53

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Bahan pangan dituntut mempunyai kandungan gizi yang baik dan juga memenuhi persyaratan keamanan pangan agar tidak menimbulkan gangguan pada konsumen. Hal ini termasuk susu dan produk susu, merupakan salah satu bahan makanan yang sempurna karena mengandung hampir semua zat-zat makanan yang diperlukan tubuh. Susu dan produk susu mempunyai potensi memindahkan bahan-bahan patogen penyebab penyakit ke manusia dan merupakan media yang sangat ideal untuk pertumbuhan dan perkembangan berbagai mikroorganisme termasuk *food pathogens* (Yves le loir *et al*, 2002). Penanganan susu sewaktu dan setelah diperah harus benar-benar higienis karena kandungan gizinya yang hampir sempurna agar kualitasnya tetap terjaga sampai ke tangan konsumen.

Salah satu hambatan yang sering terjadi dan perlu dipertimbangkan dalam peternakan sapi perah dan dalam penanganan susu adalah adanya peradangan ambing, yang biasa dikenal dengan sebutan mastitis. Mastitis atau peradangan pada jaringan internal ambing umum terjadi pada peternakan sapi perah diseluruh dunia (Duval, 1997). Mastitis mulai dikenal sejak pertama kali sapi dternakkan. Telah dilakukan berbagai macam penelitian dari berbagai kemajuan ilmu pengetahuan untuk mengetahui prevalensi mastitis dari banyak tempat peternakan sapi perah. Sekitar kurang dari 40% dari semua sapi perah diperkirakan terinfeksi mastitis pada satu ambing atau lebih (Philpot, 1984). Hasil

penelitian yang dilakukan oleh Samsiyah (2002) di Poskeswan Rejo Tangan-Tulung Agung, menunjukkan bahwa 62,11% sapi perah menderita mastitis klinis maupun sub klinis. Hasil pemeriksaan mastitis dengan CMT di KUD Purwodadi-Pasuruan yang dilakukan oleh Estoepangesti dkk (2000) juga menunjukkan bahwa kasus mastitis terjadi cukup besar yaitu 44,6%. Secara ekonomi, mastitis banyak menimbulkan kerugian karena adanya penurunan produksi susu yang mencapai 70% dari seluruh kerugian akibat mastitis. Kerugian lain timbul akibat adanya residu antibiotika pada susu, biaya pengobatan dan tenaga kerja, pengafkiran, meningkatnya biaya penggantian sapi perah, susu terbuang, dan kematian pada sapi serta adanya penurunan kualitas susu (Hurley and Morin, 2000).

Mastitis dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroorganisme, di antaranya adalah bakteri. Bakteri penyebab mastitis yang paling sering adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Coliform* dan *Pseudomonas* (Philpot, 1984). *Staphylococcus aureus* hidup di dalam dan di luar ambing pada kulit puting dan sekitar 30 – 40 % menyebabkan mastitis klinis dan subklinis dari seluruh kasus mastitis (Wattiaux, 1996). Bakteri ini dapat menyebar dari satu sapi ke sapi perah lainnya selama proses pemerahan melalui tangan pemerah, kain pembersih serta tempat penampungan susu dan menyebabkan karier kronis pada sapi perah (Jones et al, 1998).

Pengendalian mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan menjaga agar penyakit tidak menyebar luas. Pengobatan terhadap kasus *Staphylococcus aureus* mastitis biasanya hanya ditujukan untuk

membasmi agen penyebabnya, misalnya pengobatan dengan diberikan antibiotika dalam jangka waktu yang lama. Antibiotika itu sendiri dapat memberikan dampak negatif pada susu yaitu residu antibiotika sehingga dapat merugikan konsumen yang mengkonsumsi.

Guna meningkatkan keamanan susu dan produk susu dari residu antibiotika, perlu dilakukan tindakan pada manajemen peternakan yaitu: pengurangan penggunaan obat-obatan pada peternakan, lebih intensif dalam mengikuti prosedur waktu henti obat setelah pemberian antibiotika, dan dilakukan *screening* pemeriksaan residu antibiotika terhadap susu sebelum disetor ke industri produk susu.

Di Jawa Timur susu dikonsumsi sebagai susu segar dan sebagai produk susu. Jika peternak tidak melakukan *screening* residu antibiotika terhadap susu maka konsumen susu segar mempunyai resiko yang besar mengkonsumsi susu beresidu antibiotika. Sesuai dengan peraturan yang dikeluarkan sejak 1995 tentang produksi susu higienis, bahwa susu dinyatakan beresidu antibiotika jika konsentrasi antibiotika ≥ 0.016 IU/ml. Perusahaan susu boleh menolak susu dari peternak dan pengumpul susu apabila terbukti susu beresidu antibiotika (Mullan, 2001). Berdasarkan prinsip dari Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) dimana proses produksi susu hewan yang dikonsumsi manusia harus memahami 6 pokok keamanan makanan, diantaranya kandungan mikroorganisme patogen dan residu antibiotika (Guizani, 2003). Harga kit pendeteksi residu antibiotika yang sudah beredar di pasaran relatif mahal, sehingga menjadi kendala bagi peternak maupun pengumpul susu untuk melakukan uji residu antibiotika sendiri.

Pengujian yang hanya dapat dilakukan di perusahaan produk susu, menyebabkan kerugian bagi peternak dan pengumpul susu apabila susu ditolak, sehingga perlu dikembangkan kiti pendeteksi residu antibiotika yang mudah, murah dan efisien yang memungkinkan untuk digunakan oleh peternak dan pengumpul susu.

Kesulitan pendeteksian pada mastitis subklinis biasanya pengobatan hanya dilakukan pada hewan yang secara klinis menunjukkan gejala sakit. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Paryati (2002) menunjukkan bahwa mastitis subklinis yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* dengan gambaran histopatologi kelenjar ambing yang secara klinis tidak menunjukkan adanya peradangan (mastitis), pada kenyataannya menunjukkan adanya perubahan struktur kelenjar. Perubahan tersebut mempengaruhi sekresi susu secara kualitas maupun kuantitas sehingga secara ekonomi dapat merugikan peternak, dengan mengetahui patogenitas *Staphylococcus aureus* sebagai penyebab mastitis seperti yang dilaporkan, maka dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai upaya pencegahan *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis.

Hasil penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gambaran fraksi protein *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika. Diharapkan dari gambaran fraksi protein dapat menghasilkan bahan dasar yang dapat dikembangkan menjadi kandidat vaksin sebagai upaya penanganan mastitis subklinis, atau suatu kiti untuk menguji residu antibiotika pada susu dengan metoda cepat, sederhana dan murah sehingga peternak dan pengumpul susu dapat melaksanakan uji ini.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana profil fraksi protein *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika yang dinyatakan dengan Berat molekul?

1.3 Landasan Teori

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri gram positif yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada berbagai jaringan tubuh, dan sampai saat ini penisilin masih merupakan salah satu antibiotika yang digunakan dalam pengobatan terhadap penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini (Baorto and Baorto, 2002). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang paling mudah menjadi resisten terhadap beberapa antibiotika dan dianggap bakteri patogen serius sejak ditemukan 50% *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap penisilin sejak tahun 1950an. *Staphylococcus aureus* yang resisten penisilin G menghasilkan enzim beta laktamase yang menghidrolisa ikatan amida siklik dari cincin beta laktam sehingga menjadi tidak aktif (Herman, 2000). Beta laktamase merupakan suatu enzim yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* pada berat molekul 28,3 kDa (U.S.Department of Commerce on behalf of the United States, 1998). Resistensi *staphylococcus* juga ditentukan oleh plasmid dan dapat dipindahkan diantara *staphylococcus* oleh bakteriofage yang bertranduksi (Dzen, 1996), akibatnya banyak strain terjadi perubahan oleh plasmid (Jawetz dkk, 1996).

Staphylococcus aureus mempunyai tiga komponen penting dalam dinding sel. Salah satu komponennya adalah protein A yang 90% ditemukan pada

dinding sel, merupakan grup spesifik antigen yang unik dan terdapat pada semua strain *Staphylococcus aureus*. Selama sel tumbuh protein A juga terlepas ke media pembiakkan. Protein A terdiri dari satu rantai polipeptida dengan berat molekul 42 kDa (Joklik *et al*, 1992).

Staphylococcus aureus juga merupakan salah satu bakteri penyebab *Food Borne Disease* dimana *Staphylococcal food poisoning* mengikuti kontaminasi makanan dengan angka yang tinggi pada tipe *Staphylococcus aureus* dengan memproduksi enterotoksin pada makanan (Hobbs and Roberts, 1993). Enterotoksin merupakan suatu zat dapat larut yang dihasilkan oleh strain – strain tertentu *staphylococcus*, khususnya bila strain tersebut dibiakkan dalam CO₂ konsentrasi tinggi (30%) pada perbenihan setengah padat. Enterotoksin khususnya dihasilkan bila *staphylococcus* tertentu tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein (Eley, 1992; Jawetz dkk, 1996).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi protein yang dinyatakan dengan berat molekul dari *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang profil protein dari *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika dan diharapkan dapat menunjang penanggulangan penyakit bakterial.
2. Diharapkan dapat membantu pengembangan Kitt Pendeteksi residu antibiotika pada susu.

3. Diharapkan dapat membantu pengembangan pembuatan vaksin sebagai upaya penanganan penyakit yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taksonomi

Super kingdom : Prokaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Bacillales

Family : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus*

(Sumber : rekomendasi dari *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. (Biologie et Recherche)* dalam De La Fuente *et al*, 1985; [Http://Peptidase_of_staphylococcus_aureus.htm](http://Peptidase_of_staphylococcus_aureus.htm), 2001)

2.1.2 Sifat – sifat *Staphylococcus aureus*

2.1.2.1 Morfologi dan Pewarnaan

Staphylococcus adalah bakteri yang berbentuk bulat. Diameter bakteri berukuran 0,8 – 1,0 μm , dilihat di bawah mikroskop biasanya tersusun bergerombol seperti buah anggur, dapat terletak sendiri-sendiri, berpasangan atau membentuk rantai pendek (U.S. Food and Drug Administration, 2003). Bakteri bersifat non motil, tidak membentuk spora, tidak mempunyai kapsul, tidak mempunyai flagella, tumbuh dalam keadaan aerob dan fakultatif anaerob (Joklik

et al, 1992). Pewarnaan pada biakan muda bersifat gram positif sedangkan pada biakan yang lebih tua banyak sel yang menjadi gram negatif (Quinn and Carter, 2002).

2.1.2.2 Sifat Pupukan dan Biokimia

Staphylococcus aureus mudah ditumbuhkan pada media umum. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37° C serta PH optimum adalah 7.2, dapat tumbuh pada kondisi yang mengandung 20 – 30 % CO₂, dapat memfermentasi sejumlah karbohidrat menjadi asam serta dapat tumbuh baik pada media padat. *Staphylococcus aureus* pada media padat membentuk koloni berbentuk bulat, tepinya rata, permukaan halus, mengkilat, sedikit cembung, warna koloni kuning keemasan (Stewart and Beswick, 1977). Pertumbuhan pada media *broth* ditandai dengan adanya endapan berwarna putih seperti serbuk yang melekat dibagian dasar tabung (Jawetz dkk, 1996). Isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* digunakan media selektif yang mengandung NaCl dengan konsentrasi yang cukup tinggi antara 7,5% - 10% seperti Agar garam manitol (*Mannitol Salt Agar*) dan membentuk zona β hemolisin apabila ditanam pada media *Blood agar* (Davis, 1990)

Staphylococcus aureus membentuk asam tanpa gas dari glukosa, maltosa, laktosa, sukrosa, gliserol dan manitol. Membentuk NH₃, tidak dapat menguraikan *salicin*, *raffinosa* atau inulin, dan tidak membentuk indol. Reaksi terhadap *Voges Proskauer* positif, reaksi terhadap *Methyl Red* positif, mereduksi *Methylen Blue*, mereduksi nitrat menjadi nitrit, membentuk sedikit gas H₂S, mencairkan gelatin dan mengkoagulasi serum darah (Merchant and Packer, 1971).

Uji katalase positif dan uji koagulase positif karena dapat menggumpalkan plasma kelinci (Todar, 2002b).

2.1.2.3 Daya Tahan Kuman Terhadap Perlakuan Fisik dan Kimia

Staphylococcus aureus adalah bakteri yang relatif tahan terhadap pemanasan. Pemanasan pada temperatur 60°C selama 30 menit dapat menghancurkan seluruh bakteri, tetapi *Staphylococcus aureus* tidak tahan terhadap pemanasan dengan sinar matahari langsung (Merchant and Packer, 1971).

Staphylococcus aureus dapat terbunuh dalam larutan kimia formaldehid 10% selama 10 menit, phenol 2% selama 15 menit, HgCl₂ 0,5% selama satu jam. Larutan *Gentian Violet* dengan konsentrasi 1: 25.000 membunuh sel bakteri dalam waktu 5- 10 menit (Jawetz dkk, 1996).

2.1.2.4 Struktur Antigen, Toksin dan Enzim

Dinding sel *Staphylococcus aureus* kaku dan kuat karena mengandung komponen penting yaitu; peptidoglikan ribitol, protein A dan asam theikoat, tebalnya 20 – 80 nm. Peptidoglikan merupakan polimer polisakarida berfungsi sebagai eksoskeleton dari dinding sel. Asam theikoat yang merupakan polimer dari gliserol bergabung dengan peptidoglikan dapat menjadi antigenik (Rollins and Joseph, 2000). Beberapa enzim dihasilkan oleh bakteri ini antara lain : koagulase, *hyaluronidase*, *staphylokinase* (Fibrinolysin), protease, nuklease, lipase dan beta laktamase (penisilinase). *Staphylococcus aureus* juga menghasilkan toksin, antara lain;

1. Eksotoksin yang terdiri dari Cytolitik Toksin (Hemolisin), terdiri dari; α Toksin, β Toksin, γ Toksin, δ Toksin, dan Leukosidin.
2. Enterotoksin, terdiri dari Enterotoksin A, B, C, D dan E, merupakan suatu zat dapat larut yang dihasilkan oleh strain-strain tertentu *staphylococcus*, khususnya bila strain tersebut dibiakkan dalam CO₂ konsentrasi tinggi (30%) pada perbenihan setengah padat. Enterotoksin adalah protein penyebab penting keracunan makanan yang mempunyai berat molekul $2.8 - 3.5 \times 10^4$ Da (Eley, 1992; Jawetz dkk, 1996). Tahan terhadap pendidihan selama 30 menit dan tahan terhadap enzim-enzim usus. Enterotoksin khususnya dihasilkan bila *staphylococcus* tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein (Joklik *et al*, 1992).

2.1.2.5 Resistensi

Staphylococcus aureus relatif resisten terhadap kekeringan, tahan pada suhu 50° C selama 30 menit dan NaCl 9% tapi mudah dihambat oleh beberapa zat kimia seperti 3% Hexachlorophen. Kepekaan staphylococci terhadap banyak antibiotika berbeda-beda. Resistensi bakteri ini dibagi menjadi beberapa golongan:

1. Produksi beta laktamase, dibawah kontrol plasmid dan membuat beberapa organisme resisten pada penisilin (penisilin G, ampisilin dan beberapa obat sejenis). Plasmid dapat ditransmisikan lewat transduksi dan mungkin juga lewat konjugasi.
2. Resisten terhadap nafsilin, Metisilin dan oxasilin yang tidak tergantung pada produksi beta laktamase. Gen yang resisten terhadap nafsilin terdapat pada

kromosom dan kadang-kadang dimunculkan. Mekanisme resistensi terhadap nafsilin berhubungan dengan tidak dapat dicapainya *penicillin binding protein* (PBPs) pada organisme.

3. Toleransi

Berarti *Staphylococcus aureus* hanya dapat dihambat oleh obat namun tidak dapat dibunuh. Toleransi dapat terjadi karena berkurangnya aktifitas enzim autoritik pada dinding sel.

4. Plasmid dapat juga membawa gen yang resisten terhadap tetrasiklin, Eritromisin dan aminoglikosida.

(Jawetz dkk, 1996).

2.1.2.6 Patogenitas

Kemampuan patogenik *Staphylococcus aureus* didasarkan atas tingkat produksi enzim ekstraselular dan toksin yang menyebabkan kerusakan jaringan lebih berat. Pemanahan lokal (abses) merupakan sifat khas infeksi *staphylococcus*. Pada infeksi lokal ini biasanya terjadi reaksi peradangan yang terlokalisir dan terasa nyeri karena adanya pemanahan sentral yang merupakan kumpulan dari bakteri yang mati, jaringan nekrose, sel-sel mati dan reruntuhan jaringan (Jawetz dkk, 1996). *Staphylococcus* yang patogen cenderung menghasilkan koagulase, pigmen kuning, dan bersifat hemolitik. Bakteri ini berperan dalam proses penyakit pada hewan diantaranya adalah luka infeksi pada mastitis dimana jika terdapat lesi, *Staphylococcus aureus* membentuk koloni terutama pada ambing yang terinfeksi, saluran puting, dan lesi pada puting,

menyebabkan abses dan supuratif, dan dermatitis pada semua spesies hewan (Carter *and* Cole, 1990; Meyer *and* Harvey, 2002; Todar, 2002b).

2.1.3 Pengobatan

Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat diobati dengan hasil yang memuaskan menggunakan antibiotika, namun *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang paling mudah resisten terhadap beberapa antibiotika sehingga diperlukan uji kepekaan terhadap antibiotika (Jawetz dkk, 1996). Pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* sebelum tahun 1950 meliputi penggunaan penisilin G yang merupakan antibiotika beta laktam, namun di akhir tahun 50-an strain *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotika tersebut menambah kekhawatiran. Strain-strain yang resisten secara tipikal memproduksi enzim beta laktamase, yang menginaktifkan antibiotika beta laktam (Stapleton *and* Taylor, 2002).

Di lapangan ada banyak jenis antibiotika yang digunakan untuk pengobatan infeksi bakteri ini. Merchant *and* Packer (1971) menyebutkan bahwa *Staphylococcus aureus* sensitif terhadap streptomisin, basitrasin, neomisin, cathomisin, spiramisin dan vancomisin, selain dengan golongan tetrasiklin. Antibiotika golongan eritromisin sebaiknya tidak digunakan sebagai obat tunggal dalam pengobatan menahun karena resistensi cenderung timbul dengan begitu cepat (Jawetz dkk, 1996).

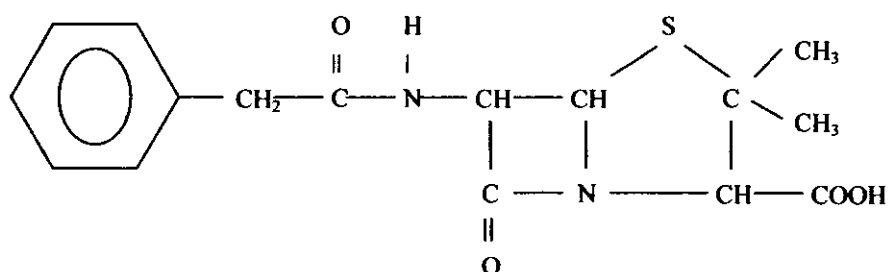
2.2. Penisilin G

2.2.1 Asal dan Kimia

Penisilin pertama kali ditemukan pada tahun 1929 oleh Fleming ketika mendapati *Penicillium notatum* menghambat pertumbuhan bakteri pada media pembiakkan *Nutrient Agar* (Arnold, 1990). Penisilin G termasuk dalam grup penisilin alam dan merupakan golongan antibiotika beta laktam selain sefalosporin (Herman, 2000). Penisilin G merupakan asam organik yang terdiri dari satu inti siklik yang tersusun dari cincin tiazolidin dan cincin beta laktam, dan satu rantai samping yang merupakan gugus amino bebas yang mengikat gugus benzil (Ganiswara, 1995; Gerald *et al*, 1995).

2.2.2 Aktivitas Antibiotika

Penisilin G merupakan antibiotika spektrum sempit, aktif melawan bakteri gram positif. Penisilin G menurunkan asam lambung dan merusak staphylococcal resisten (Katzung, 2001). Penisilin G menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel bakteri dan menghasilkan efek bakterisid pada bakteri sensitif yang aktif membelah (Goodman *et al*, 2001).



Gambar 1. Struktur Kimia Penisilin G
(Ronald, 1988; Gerald *et al*, 1995; Goodman *et al*, 2001)

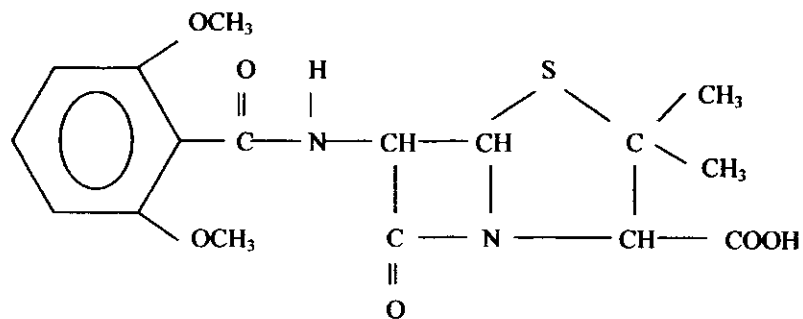
2.3 Metisilin

2.3.1 Asal dan Kimia

Metisilin merupakan antibiotika pertama penisilin semi sintesis resisten penisilinase, derivat dari inti penisilin yaitu asam 6 – aminopenisilase. Metisilin mempunyai aktivitas melawan staphylococci yang resisten terhadap antibiotika Penisilin G (DiPalma *and* DiGregorio, 1990).

2.3.2 Aktivitas Antibiotika

Metisilin sebagai antibiotika penisilin resisten penisilinase mempunyai aktivitas yang tinggi dalam melawan *Staphylococcus aureus* yang sensitif dan resisten penisilin G (Katzung, 2001). Metisilin merupakan antibiotika yang aktif dalam melawan staphylococci yang menghasilkan penisilinase (Arnold, 1990). Bakteri yang resisten terhadap Metisilin harus benar-benar diwaspadai karena biasanya juga resisten terhadap semua golongan penisilin, streptomisin, kanamisin, kloramfenikol dan tetrasiklin (Goodman *et al*, 2001).



Gambar 2. Struktur Kimia Metisilin
(Ganiswara, 1995; Goodman *et al*, 2001; Katzung, 2001)

2.4 Gentamisin

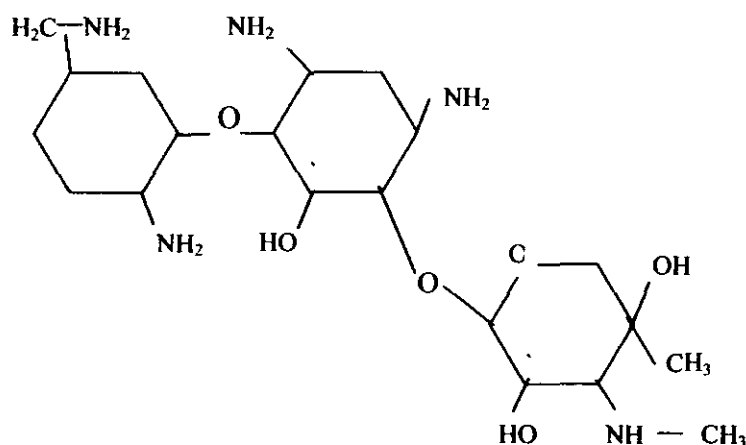
2.4.1 Asal dan Kimia

Gentamisin merupakan antibiotika golongan aminoglikosid, derivat dari spesies actinomyces, yaitu *Micromonospora purpurea* (Katzung, 2001). Gentamisin merupakan senyawa yang terdiri dari dua atau lebih gugus gula amino yang terikat lewat ikatan glikosidik pada inti heksosa, yaitu 2-deoksistreptamin (Ganiswara, 1995). Antibiotika ini efektif dalam melawan bakteri gram positif dan gram negatif, dan bersifat basa kuat, mudah larut dalam air dan sangat polar pada bentuk senyawa polikation.

2.4.2 Aktivitas Antibiotika

Gentamisin adalah antibiotika berspektrum luas yang bekerja untuk terikat pada ribosom 30S dan menghambat sintesis protein. Terikatnya antibiotik ini pada ribosom 30S mempercepat transport gentamisin ke dalam sel diikuti dengan kerusakan membran sitoplasma dan disusul dengan kematian sel (Ganiswara, 1995). Gentamisin sulfate, 2 – 10 µg/mL, dapat menghambat beberapa strain staphylococci, coliform dan beberapa bakteri gram negatif lainnya dalam bentuk in vitro (Katzung, 2001). Aktivitas in vitro gentamisin melawan lebih dari 90% strain *Staphylococcus aureus* dan 75% strain *Staphylococcus epidermidis*. Kemampuan klinik gentamisin tunggal untuk penanganan infeksi staphylococci serius tidak efektif akan tetapi kombinasi gentamisin dengan vancomisin atau penisilin dapat menghasilkan efek bakterisidal yang sangat kuat (Goodman *et al*, 2001; Katzung, 2001). Terjadinya resistensi gentamisin pada staphylococci terjadi selama antibiotik bekerja, dimana diperantarai oleh

terjadinya konjugasi kode plasmid dari modifikasi enzim antibiotik ini yang diikuti dengan terjadinya staphylococci resisten Metisilin (Goodman *et al*, 2001).



Gambar 3. Struktur Kimia Gentamisin
(Ganiswara, 1995; Katzung, 2001)

2.5 Eritromisin

2.5.1 Asal dan Kimia

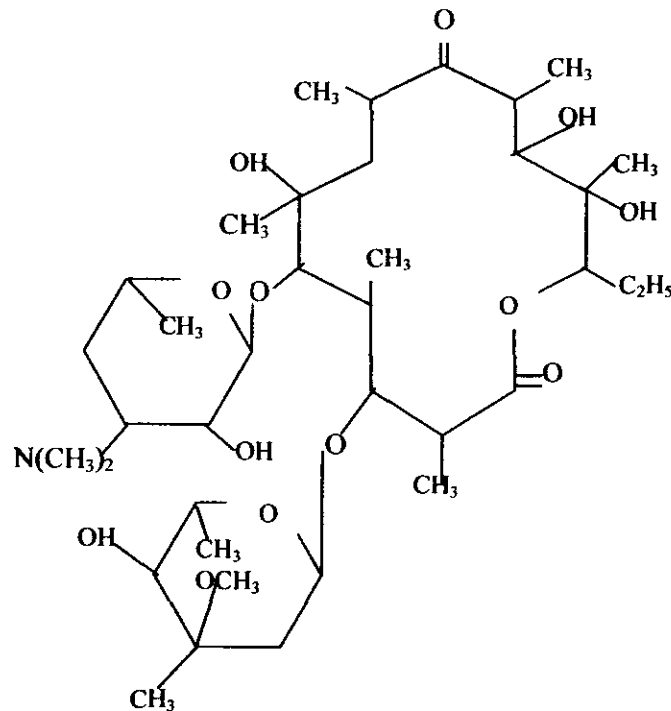
Eritromisin merupakan salah satu dari antibiotika golongan makrolid, dimana terdapat cincin lakton yang besar dalam rumus molekulnya. Eritromisin dihasilkan oleh suatu strain *Streptomyces erythreus* (Todar, 2002a). Antibiotika ini tidak stabil dalam suasana asam, kurang stabil pada suhu kamar tetapi cukup stabil dalam suhu rendah. Aktivitas *in vitro* paling besar dalam suasana alkalis (Ganiswara, 1995).

2.5.2 Aktivitas Antibiotika

Eritromisin adalah antibiotika aktif untuk melawan bakteri gram positif, antara lain *Staphylococcus* dan beberapa bakteri lainnya yang dapat memproduksi beta-laktamase, resisten terhadap penisilin dan beberapa yang resisten terhadap

antibiotika makrolid lainnya. Eritromisin juga diusulkan untuk pengobatan mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* (Micromedex Inc. 1995).

Mekanisme kerjanya bersifat bakteriostatik dan bisa menjadi bakterisidal dengan konsentrasi tinggi. Eritromisin dapat masuk ke sel dan mengikat ribosomal sub unit 50s, menghambat translokasi peptida dan juga menghambat sintesa protein. Eritromisin hanya efektif menghambat kecepatan pembelahan bakteri. Bakteri yang resisten dapat merubah reseptor ribosom dan menghalangi masuknya Eritromisin kedalam sel (DiPalma *and* DiGregorio, 1990).



Gambar 4. Struktur Kimia Eritromisin
(DiPalma *and* DiGregorio, 1990; Ganiswara, 1995; Katzung, 2001)

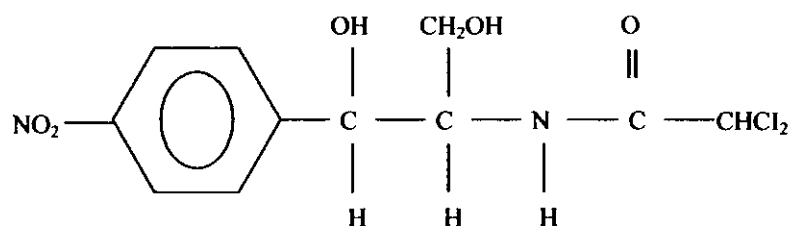
2.6. Kloramfenikol

2.6.1 Asal dan Kimia

Antibiotika Kloramfenikol pertama kali ditemukan pada tahun 1947, merupakan antibiotika spektrum luas yang pertama. Diisolasi dari *Streptomyces venezuelae* (Todar, 2002a), karena mempunyai daya antibiotika yang kuat maka penggunaan obat ini meluas dengan cepat sampai pada tahun 1950. Kloramfenikol merupakan kristal putih yang sukar larut dalam air (1 : 400) dan rasanya sangat pahit (Ganiswara, 1995).

2.6.2 Aktivitas Antibiotika

Merupakan antibiotika spektrum luas yang menghambat sintesis protein, pada enzim peptidil tranferase yang berperan sebagai katalisator untuk membentuk ikatan-ikatan peptida pada proses sintesis protein bakteri dan mempunyai efek bakteristatik. Pada konsentrasi tinggi dapat bersifat bakterisid terhadap bakteri-bakteri tertentu (Bevan *and* Thompson, 1983).



Gambar 5. Struktur Kimia Kloramfenikol
(DiPalma *and* DiGregorio, 1990; Ganiswara, 1995; Katzung, 2001)

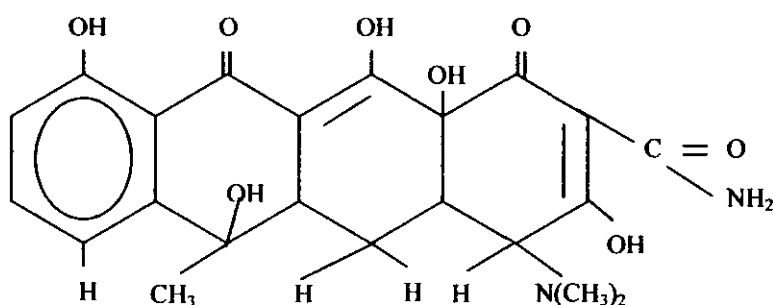
2.7 Tetrasiklin

2.7.1 Asal dan Kimia

Tetrasiklin adalah antibiotika yang dibuat secara semisintetik dari klortetrasiklin tetapi juga dapat diperoleh dari spesies *Streptomyces* lain. Tetrasiklin merupakan basa yang sukar larut dalam air, tetapi bentuk garam natrium atau garam HClnya mudah larut, dalam keadaan kering bentuk basa dan garam HCl tetrasiklin bersifat relatif stabil. Kebanyakan tetrasiklin dalam larutan sangat labil jadi cepat berkurang potensinya (Ganiswara, 1995).

2.7.2 Aktivitas Antibiotika

Tetrasiklin merupakan antibiotika spektrum luas yang aktif melawan gram positif dan gram negatif (Goodman *et al*, 2001). Mekanisme kerja tetrasiklin adalah menghambat sintesis protein, dengan cara mengadakan ikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi terikatnya RNA yaitu RNA *transfer aminoasil* pada situs spesifik di ribosom selama pemanjangan rantai peptida (Katzung, 2001).



Gambar 6. Struktur Kimia Tetrasiklin
(Bevan *and* Thompson, 1990; Goodman *et al*, 2001; Katzung, 2001)

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium VPH (Veterinary Public Health) dan TDC (Tropical Disease Center) Unair. Waktu penelitian mulai bulan Agustus 2003 – Maret 2004.

3.2 Langkah-langkah Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yang meliputi isolasi dan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, pembiakkan bakteri, pemanenan, dan isolasi protein dari bakteri *Staphylococcus aureus*, dan identifikasi protein menggunakan SDS PAGE.

3.3 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, yaitu untuk mengidentifikasi fraksi protein *Staphylococcus aureus* dari susu yang sensitif terhadap beberapa antibiotika. Penelitian dimaksudkan untuk menjawab pertanyaan tentang bagaimana profil fraksi protein dari *Staphylococcus aureus* pada susu yang sensitif terhadap beberapa antibiotika berdasarkan berat molekul, oleh karena itu penelitian ini termasuk penelitian deskriptif.

3.4 Bahan dan Materi Penelitian

3.4.1 Unit Analisis

Unit analisis penelitian ini adalah protein *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Isolat Bakteri

Bahan-bahan yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari 20 sampel susu segar yang diperoleh langsung dari peternakan sapi perah. Media untuk pertumbuhan bakteri yaitu *Nutrient Agar* (NA); media selektif untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu *Mannitol Salt Agar* (MSA), dan media differensial *Blood Agar* (BA); media untuk uji kepekaan bakteri *Triptic Soy Broth* (TSB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA); media inokulasi bakteri untuk uji koagulase yaitu *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth*; NaCl fisiologis 0,9%, Carbol Gentian Violet, lugol, alkohol aseton, cairan safranin untuk pewarnaan gram; larutan H₂O₂ 3% untuk uji katalase; plasma darah kelinci untuk uji koagulase; Penisilin G 10 IU, Kloramfenikol 30µg, Metisilin 5µg, berbentuk kertas disk (OXOID Limited, Basingstoke-Hampshire-England); Tetrasiklin 30µg, Gentamisin 10µg, Eritromisin 15µg, berbentuk kertas disk (Becton Dickinson, Becton Dickinson and Company Sparks, USA).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah plastik sekali pakai steril, kertas label, spidol, *autoclave*, cawan petri, bunsen dan ose, inkubator, tabung reaksi steril, pipet, mikropipet, *cotton swab* steril, kaca obyek, gelas erlemeyer, neraca elektrik, *vortexer*, jangka sorong, kapas, dan mikroskop.

b. Pemanenan dan Isolasi Protein

Alat yang digunakan adalah *shaker*, sentrifus, *grinder*, tabung, dan peralatan gelas lainnya.

Bahan yang digunakan adalah media *Tryptic Soy Broth* (TSB) untuk pembiakkan bakteri, Phospat Buffer Saline (PBS).

c. Elektroforesis dengan SDS PAGE 10%

Meliputi peralatan utama elektroforesis lengkap dengan pengatur voltase, mikropipet, pipet tip, *shaker*, *waterbath*, dan peralatan gelas lainnya.

Bahan kimia yang digunakan adalah acrylamid dan bis acrylamid; Tris HCl pH 8.8; Tris HCl pH 6.8; SDS 0,5%; aquades; temed; APS 10% suhu 4°C; *running buffer*; *laemlli buffer*; ethanol; methanol 10%; asam asetat 10%; asam asetat 7%; Coomassie Brilliant Blue R-250; butanol.

3.5 Metode Penelitian

3.5.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel susu diambil dengan ose steril dan ditanam secara “streak” pada media *Nutrient Agar* (NA). Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Koloni bakteri yang diduga staphylococci dengan pigmen berwarna kuning terang, berkilau – kilauan, menonjol dan berbentuk padat bulat kecil yang tumbuh pada media tersebut (Merchant *and* Packer, 1971), kemudian dilakukan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* (Lampiran 2).

3.5.2 **Screening Bakteri *Staphylococcus aureus* yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika menggunakan Metode Cakram Difusi**

Metode ini dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui kepekaan bakteri yang telah direkomendasikan oleh *The United States Food and National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Pengukuran diameter hambatan yang terbentuk mengikuti standar *Kirby – Bauer* (Prier *et al*, 1975; Ronald, 1988). Antibiotika dipilih berdasarkan aktifitasnya terhadap gram positif *cocci*, antara lain: Penisilin G (P) 10 unit, Metisilin (Met) 5 µg, Gentamisin (CN) 10µg, Eritromisin (E) 15µg, Kloramfenikol (C) 30µg, dan Tetrasiklin (TE) 30µg. Bakteri yang sebelumnya telah diidentifikasi dan dipastikan adalah *Staphylococcus aureus*, ditanam dalam 1 - 2 ml media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dan diinkubasi pada suhu 37° C. Kekeruhannya disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 yang sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ bakteri per ml (Wickerham, 2002). Suspensi bakteri yang telah setara di tanam pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) secara *streak* dengan menggunakan *cotton swab* secara merata di seluruh permukaan Agar. Disk yang terisi antibiotika di tempatkan di atas media MHA yang telah ditanam bakteri dengan menggunakan pinset. Inkubasi selama 18-24 jam. Diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri oleh antibiotika diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Tabel 1. Zona Hambatan Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Standar Kirby - Bauer

Antibiotika	Disk konsentrasi	Diameter Zona Hambatan (mm)		
		Resisten	<i>Intermediate</i>	Sensitif
Penisilin G	10 unit	20 - kurang	21 – 28	29 - lebih
Metisilin	5 µg	9 - kurang	10 – 13	14 - lebih
Gentamisin	10 µg	12 - kurang	13 – 14	15 - lebih
Eritromisin	15 µg	13 - kurang	14 – 22	23 - lebih
Kloramfenikol	30 µg	12 - kurang	13 – 17	18 - lebih
Tetrasiklin	30 µg	14 - kurang	15 - 18	19 - lebih

(Sumber : IFU 33000, 2003)

3.5.3 Pembiakan Bakteri *Staphylococcus aureus* yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika

Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanam pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB). Inkubasi pada suhu 37°C diatas *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 100 getaran/detik.

3.5.4 Pemanenan, Pemecahan dan Pemisahan Protein Bakteri *Staphylococcus aureus* yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika

Bakteri *Staphylococcus aureus* dipindahkan dalam tabung sentrifus untuk dilakukan pemanenan pada suhu 4° C, dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan bakteri dicuci dengan PBS (lampiran 4) sebanyak tiga kali, selanjutnya endapan bakteri ditambah alumina sama banyak dilakukan *grinding* selama 30 menit untuk pemecahan komponen sel bakteri (Weir, 1978). Larutan hasil *grinding* disentrifus bertingkat dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4° C, supernatan disentrifus lagi dengan kecepatan 12.000 rpm, dan terakhir supernatan disentrifus dengan kecepatan 16.000 rpm. Supernatan yang didapat disimpan pada suhu 4°C, sebagai persiapan SDS PAGE.

3.5.5 Identifikasi Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polycrilamine Gels Elektrophoresis*)

a. Mencetak *separating gel* 10%

Langkah pertama adalah mencampurkan bahan-bahan *separating gel* 10% sampai homogen (Lampiran 4). Memasukkan campuran bahan tersebut dengan cepat kedalam gelas plate yang telah bersekat dan difiksasi sedemikian rupa agar hasil *separating gel* rata. Ditambahkan butanol di atasnya untuk meratakan bagian atas *separating gel*. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar agar *separating gel* padat. Langkah terakhir membuang butanol dan mencuci *separating gel* dengan *running buffer* (Lampiran 4). *Separating gel* dibersihkan dan dikeringkan dengan kertas filter.

b. Mencetak *Stacking gel* 4%

Mencetak *stacking gel* seperti cara mencetak *separating gel*. Setelah bahan *stacking gel* (Lampiran 4) tercampur homogen, kemudian menuangkannya pada cetakan *separating gel* dan memasukkan *comb*. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat. Terakhir melepaskan *comb*, kemudian membersihkan dan mencuci *stacking gel* dengan *running buffer*.

c. Menyiapkan Sampel

Sampel *Staphylococcus aureus* berbentuk supernatan dicampur dengan *Laemmli buffer* (Lampiran 4) dengan perbandingan 2:1 kedalam tabung effendof yang lubangnya telah dilubangi dengan jarum $\frac{1}{2}$ tusukan. Dilakukan denaturasi protein dengan cara memanaskan campuran tersebut pada suhu 100° C selama 5 menit.

d. Elektroforesis

Gelas plate dipasang pada elektroforesis (sebelumnya sekat dilepas) dan gelas plate difiksasi dengan baik. Memasukkan cetakan pada *stacking gel* dan elektroforesis dinyalakan pada voltase 125 V, 25 mA dan yang perlu diperhatikan jangan sampai ada gelembung udara. Menghentikan elektroforesis harus menunggu sampai sampel turun melewati *separating gel*. Hasil elektroforesis yang didapatkan diproses lagi dalam beberapa tahap. Tahap pertama dilakukan pewarnaan selama 5 menit pada larutan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (Lampiran 4). Tahap kedua pencucian dengan 10% methanol/10% asam asetat sampai pita (*band*) terlihat dan terwarnai dengan jelas. Tahap terakhir menyimpan gel dalam larutan yang terdiri dari 7% asam asetat agar gel tidak rusak. Semua tahapan diatas dilakukan diatas *shaker* dengan kecepatan 42 getaran/detik dan diakhiri dengan membuang cairan (Axelsen, 1983; Mayer and Walker, 1987).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil Uji Kepekaan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Cakram Difusi terhadap Beberapa Antibiotika

Sembilan sampel dari 20 sampel susu yang positif teridentifikasi *Staphylococcus aureus* (Lampiran 3), dilakukan uji kepekaan antibiotika dengan metode cakram difusi. Dihasilkan semua sampel *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap antibiotika metisilin, gentamisin, eritromisin, kloramfenikol, dan tetrasiklin kecuali dua sampel yang resisten gentamisin, tiga sampel yang resisten eritromisin dan satu sampel yang sensitif semua antibiotika. Hasil Uji Kepekaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Kepekaan *Staphylococcus aureus*

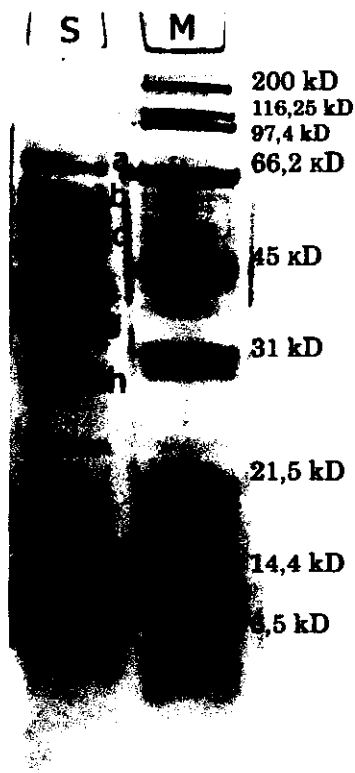
No	Uji Kepekaan Bakteri					
	P 10 IU	Met 5 μ g	CN 10 μ g	E 15 μ g	C 30 μ g	TE 30 μ g
1	21,71 ^I	22,66 ^S	15,10 ^S	26,74 ^S	21,76 ^S	32,12 ^S
2	26,07 ^I	23,41 ^S	17,11 ^S	21,38 ^R	24,54 ^S	28,61 ^S
3	21,05 ^I	17,40 ^S	21,68 ^S	21,16 ^R	23,38 ^S	23,10 ^S
4	19,60 ^R	20,84 ^S	11,77 ^R	26,18 ^S	25,88 ^S	30,70 ^S
5	18,77 ^R	21,46 ^S	17,27 ^S	26,52 ^S	24,33 ^S	31,94 ^S
6	21,50 ^I	23,43 ^S	15,97 ^S	22,58 ^R	21,87 ^S	30,90 ^S
7	29,50 ^S	20,01 ^S	16,22 ^S	24,12 ^S	26,90 ^S	34,08 ^S
8	18,60 ^R	21,60 ^S	20,99 ^S	26,71 ^S	18,12 ^S	28,18 ^S
9	20,70 ^R	23,71 ^S	8,34 ^R	26,60 ^S	23,84 ^S	19,97 ^S

S: Sensitif; I: Intermediate; R: Resisten.

P: Penisilin G; Met: Metisilin; CN: Gentamisin; E: Eritromisin; C: Kloramfenikol; TE: Tetrasiklin

4.2 Hasil Fraksinasi Protein *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan SDS PAGE 10%

Hasil fraksinasi protein dari *Staphylococcus aureus* dianalisa dengan metode SDS PAGE 10% dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* menunjukkan adanya protein yang diekspresikan dari sampel bakteri *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika. Berdasarkan berat molekul fraksi-fraksi protein yang tampak pada gel Polycrylamid telah didapatkan 11 fraksi Protein yaitu : 67 kDa, 55 kDa, 49 kDa, 45,5 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 11,4 kDa dan 5,3 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 7. Hasil Fraksinasi Protein *Staphylococcus aureus* menggunakan SDS PAGE 10%

Keterangan :

KOLOM M	=	Marker
KOLOM S	=	Sampel <i>Staphylococcus aureus</i>
Tanda a	=	67 kDa
Tanda b	=	55 kDa
Tanda c	=	49 kDa
Tanda d	=	45,5 kDa
Tanda e	=	42 kDa
Tanda f	=	37 kDa
Tanda g	=	35 kDa
Tanda h	=	31 kDa
Tanda i	=	28 kDa
Tanda j	=	11,4 kDa
Tanda k	=	5,3 kDa

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Uji Kepekaan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Cakram Difusi terhadap Beberapa Antibiotika

Sampel yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika. *Staphylococcus aureus* merupakan strain yang mudah resisten terhadap antibiotika sehingga dianjurkan terlebih dahulu diuji kepekaannya terhadap antibiotika untuk membantu penentuan obat-obat sistemik. Sesuai dengan data dari *Veterinary Laboratories Agency* (VLA) pada tahun 1998-1999 terjadi peningkatan resistensi terhadap beberapa antibiotika, antara lain; penisilin G, ampicilin, amoksisilin, gentamisin, tetrasiklin, dan makrolid (Chappell and Teale, 2001). Uji kepekaan terhadap antibiotika pada peternakan sapi perah biasanya menggunakan antibiotika Penisilin G, Ampicilin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Metisilin, Eritromisin, Tilosin untuk mencegah penumpukan antibiotika yang akan menyebabkan residu antibiotika (Tikofsky, 2000; Knappstein *et al*, 2003).

Hasil uji kepekaan menunjukkan dari sembilan sampel positif *Staphylococcus aureus* didapatkan semua sampel yang sensitif terhadap antibiotika metisilin, gentamisin, eritromisin, kloramfenikol, dan tetrasiklin kecuali dua sampel yang resisten gentamisin dan satu sampel yang sensitif semua antibiotika. Salah satu kemampuan resistensi *Staphylococcus aureus* adalah menghasilkan enzim beta laktamase yang dapat menghidrolisa amida siklik dari cincin beta laktam sehingga tidak aktif (Herman, 2000). Data yang dihasilkan

dapat dijadikan sebagai data acuan tambahan untuk mengontrol maupun mengurangi pemberian antibiotika penisilin G dan turunannya, juga untuk mencari antibiotika alternatif yang lebih tepat.

5.2 Fraksinasi Protein *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan SDS PAGE 10%

Pita protein dari sampel yang terekspresi dari hasil SDS PAGE, menunjukkan adanya variasi protein berdasarkan berat molekul.

Hasil fraksinasi protein didapatkan 11 fraksi protein yaitu; 67 kDa, 55 kDa, 49 kDa, 45,5 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 11,4 kDa dan 5,3 kDa.

Pita (*band*) protein dari 11 fraksi yang terekspresi, didapatkan protein spesifik dengan berat molekul 28 kDa diduga adalah enzim beta laktamase, enterotoksin dengan berat molekul 30 kDa dan 35 kDa, dan protein A dengan berat molekul 42 kDa.

Beta laktamase (penisilinase) yang teridentifikasi pada berat molekul 28 kDa. Sesuai dengan laporan dari *U.S. Department of Commerce on behalf of the United States* (1998) yang melaporkan bahwa berat molekul beta laktamase dari *Staphylococcus aureus* adalah 28,3 kDa. Protein ini merupakan salah satu enzim yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* sehingga terjadi resistensi terhadap antibiotika beta laktam pada jumlah yang banyak (Goodman *et al*, 2001). Beta laktamase didapatkan secara perolehan dari gen *Staphylococcus aureus* dan termasuk *acquired resistances*. Enzim ini telah dideteksi keberadaannya pada *Staphylococcus* jauh sebelum penggunaan antibiotika penisilin meluas, tetapi

frekuensi keberadaannya masih sangat sedikit, dan terjadi peningkatan seiring dengan meluasnya pemakaian antibiotika penisilin. Penggunaan antibiotika penisilin yang terus menerus dapat mengakibatkan pembentukan beta laktamase dalam jumlah yang banyak (Cimolai, 2001). Staphylococcal penisilinase dihasilkan oleh plasmid yang mengandung gena, sehingga menyebabkan sel tersebut resisten terhadap penisilin. Dalam keadaan pertumbuhan biasa plasmid tidak diperlukan oleh sel. Adanya plasmid baru terlihat bila gena yang dikandungnya memberikan sifat-sifat baru pada tuan rumah yaitu bakteri (Jawetz dkk, 1996).

Protein dengan berat antara 30 kDa dan 35 kDa diduga adalah enterotoksin A, B, C, D, E, F, merupakan salah satu toksin penyebab keracunan makanan yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*. Sesuai dengan data dari Freeman (1985) dan Eley (1992) dalam *Toxic bacterial food poisoning* bahwa berat molekul enterotoksin *Staphylococcus aureus* A, B, C, D, E, F berkisar antara 28 – 35 kDa. Enterotoksin dihasilkan apabila *Staphylococcus* tumbuh pada media yang mengandung karbohidrat dan protein (Hobbs and Roberts, 1993).

Protein A yang merupakan salah satu komponen penting dinding sel *Staphylococcus aureus* yang terikat pada bagian Fc molekul IgG, kecuali IgG3 yang terdeteksi pada berat molekul 42 kDa sesuai dengan data dari Joklik *et al* (1992) dan Jawetz dkk (1996). Bagian Fab pada IgG yang terikat pada protein A bebas untuk berikatan dengan antigen spesifik. Protein A merupakan reagen penting dalam imunologi dan teknologi diagnostik laboratorium (Jawetz dkk, 1996).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan sembilan sampel yang teridentifikasi *Staphylococcus aureus* didapatkan satu sampel *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap beberapa antibiotika. Menggunakan metode SDS PAGE 10% dengan pewarnaan *Coomasie Brilliant Blue* diidentifikasi adanya 11 fraksi protein *Staphylococcus aureus* dari sampel yang sensitif terhadap beberapa antibiotika berdasarkan berat molekul, antara lain; 67 kDa, 55 kDa, 49 kDa, 45,5 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 11,4 kDa dan 5,3 kDa. Didapatkan protein spesifik dari *Staphylococcus aureus* yaitu: Protein A dengan berat molekul 42 kDa, enterotoksin (A, B, C, D, E, F) dengan berat molekul 31 dan 35 kDa dan beta laktamase dengan berat molekul 28 kDa.

6.2. Saran

Berdasarkan kajian yang telah dilaksanakan, maka saran yang dapat diajukan adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dilakukan pemurnian protein spesifik yang dapat digunakan untuk pengembangan kitt pendeteksi residu antibiotika dan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui protein spesifik yang imunogenik untuk pengembangan vaksin sub unit *Staphylococcus aureus*.

RINGKASAN

Rianti Mariani. Profil Fraksi Protein *Staphylococcus aureus* dari Susu yang Sensitif terhadap Beberapa Antibiotika. Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan Dadik Raharjo, M. Kes., Drh selaku pembimbing pertama dan Retno Bijanti, M. S., Drh selaku pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fraksi protein *Staphylococcus aureus* dari susu yang sensitif terhadap beberapa antibiotika berdasarkan berat molekul. *Staphylococcus aureus* yang telah diidentifikasi dilakukan uji kepekaan antibiotika dengan metode cakram difusi dengan beberapa antibiotika, antara lain; Penisilin G, Metisilin, Gentamisin, Eritromisin, Kloramfenikol dan Tetrasiklin. Hasil positif sensitif antibiotika kemudian dilakukan pembiakkan pada media *Tryptic Soy Broth*, pemanenan dengan sentrifus, dan pemecahan bakteri dengan metode *grinding*. Protein dari sampel dipisahkan dengan sentrifus bertingkat dan dianalisis dengan SDS PAGE 10% dengan pewarnaan *Coomasie Brilliant Blue* untuk mengetahui masing-masing berat molekul dari protein tersebut.

Hasil pengamatan menunjukkan adanya 11 fraksi protein *Staphylococcus aureus* berdasarkan berat molekul, antara lain; 67 kDa, 55 kDa, 49 kDa, 45,5 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 35 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 11,4 kDa dan 5,3 kDa. Didapatkan protein spesifik yang dimiliki oleh *Staphylococcus aureus* yaitu: Protein A dengan berat molekul 42 kDa, enterotoksin dengan berat molekul 31-35 kDa, dan beta laktamase dengan berat molekul 28 kDa.

Berdasarkan penelitian tersebut, disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memurnikan protein spesifik dan untuk mengetahui protein spesifik yang imunogenik dari *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, E. 1990. *Vol. 1: General Bacteriology and Immunity. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity.* 8th ed. British Library Cataloguing in Publication Data. London. pp: 112-116.
- Axelsen, NH. 1983. *Handbook of Immunoprecipitation-In-Gel Techniques.* Blackwell Scientific Publications. Australia.
- Baorto, EP., and D. Baorto. 2002. *Staphylococcus aureus Infection.* eMedicine. Com, Inc. <http://eMedicine - Staphylococcus Aureus Infection Article by Elizabeth P Baorto, MD, MPH.htm>.
- Bevan, JA., and JH. Thompson. 1983. *Essentials of Pharmacology: Introduction to The Principles of drug Action.* 3rd ed. Harper and Row, Publishers, Inc. Philadelphia. pp: 577; 588-592.
- Boyd, RF. 1995. *Chapter 17: The Gram-Positive Cocci. Basic Medical Microbiology.* 4th ed. Little, Brown and Company (Inc.). pp: 247-251.
- Carter, GR., and JR. Cole. 1990. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology.* 5th ed. Academic Press, Inc. USA. pp : 201 – 205.
- Chappell. S., and CJ. Teale. 2001. *Antimicrobial sensitivity Report 1999.* Department for Environment, Food and Rural affairs. HMSO Licensing Division.
- Cimolai, N. 2001. *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections.* Marcel Dekker, Inc. United States of America.
- Davis, BD. 1990. *Microbiology, including immunology and molecular genetics.* 4th ed. J. B. Lippincott Company.
- De La Fuente, R., G. Suarez, and KH, Schleifer. 1985. *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep.* Int. J. Syst. Bacteriol. pp 35:99-102.
- DiPalma, JR., and GJ. DiGregorio. 1990. *Basic Pharmacology In Medicine.* 3rd ed. McGraw-Hill, Inc. Singapore.
- Duval, J. 1997. *Testing mastitis without antibiotics.* Ecological Agriculture Projects. <http://www.eap.mcgill.ca/Publications/EAP69.htm>.

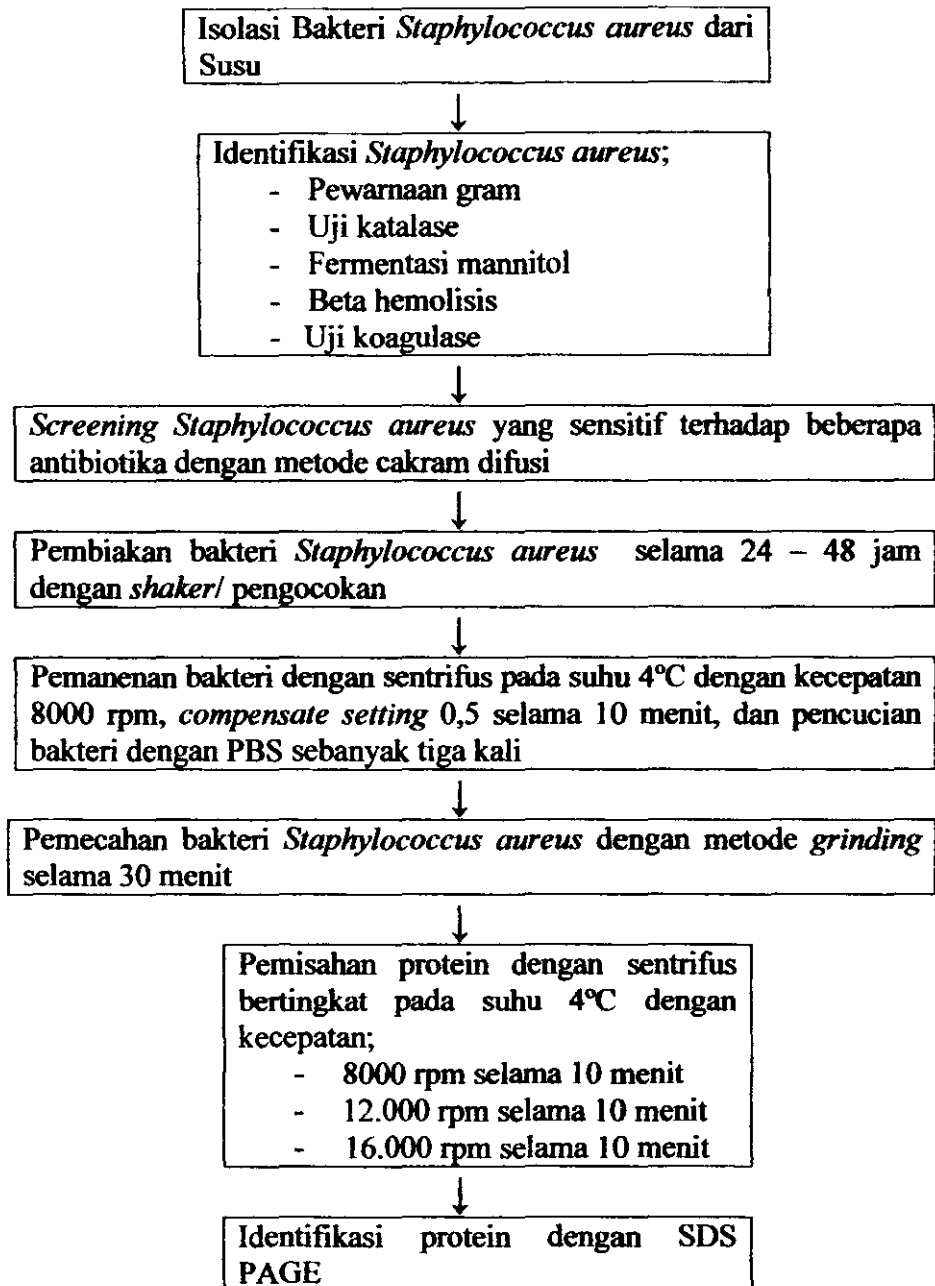
- Dzen, SM. 1996. Methicillin Resistan *Staphylococcus aureus* (MRSA) yang diisolasi dari rongga hidung orang dewasa sehat. *Majalah Kedokteran Unibraw*. Vol XII. No. 1. Universitas Brawijaya.
- Eley, AR. 1992. *Microbial Food Poisoning*. Published by Chapman and Hall. 2 – 6 Boundary Row. London SE1 8HN. United Kingdom. pp: 37-39.
- Elsevier. 1984. *Testing Methods In Food Microbiology: Development In Food Science*. 6 Rev. English version. Central Food Research. Institute Budapest, Hungary. pp: 228.
- Estoepangestie ATS., S. Prawesthirini, dan Budiarto. 2000. Peta Resistensi Antibiotika kuman Penyebab Mastitis pada Sapi Perah di Wilayah Kerja KUD Dadi Jaya Kec. Purwodadi, Kab. Pasuruan, Prop. Jawa Timur. Laporan Penelitian Hibah Proyek Due-Like. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Freeman, BA. 1985. *Burrow's Textbook of Microbiology*. 22th ed. WB Souder Company. Philadelphia. pp: 138; 374 -375.
- Fox, MT. 2000. "Normal Flora Staphylococci". *Identification of Gram Positif Bacteria*. Indiana University School of Medicine homepage.
- Ganiswara, SG. 1995. Farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. pp: 622-626; 651-652; 657-658.
- Gerald, JF., BR, Funke, and CL, Case. 1995. *Chapter 20: Antimicrobial Drug. Microbiology: An Introduction*. The Benyamin/Cumming Publishing Company. pp: 498-500; 503.
- Goodman, LS., A. Gilman, and JG. Hardman. 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. MacGraw-Hill Companies.
- Guizani, N. 2003. *Risk Assessment of Dairy Products Department of Food Science and Nutrition*. Seminars. College of Agriculture and Marine Sciences. Sultan qaboos University. <http://www.mctmnet.gov.om/mainSite/CHcommittee/seminars/sem1.asp?pl=E>
- Herman, MJ. 2000. Antibiotika Beta Laktam. Puslitbang Farmasi Badan Libangkes. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Hobbs, BC., and D. Roberts. 1993. *Food Poisoning and Food Hygiene*. 6 rev. ed. British Library Cataloguing in Publication Data.

- Hopkins, C., and G. Waggoner. 2003. *Identification of Two Unknown Microorganism*. Unknown mixture/44.
- [Http://Peptidase of staphylococcus aureus.htm](http://Peptidaseofstaphylococcus aureus.htm). 2001. *Staphylococcus aureus*.
- Hurley, WL., and DE. Morin. 2000. *Mastitis Lesson A. Lactation Biology*. ANSCI 308. <http://classesacas.uiuc.edu/Ansci308/>.
- IFU 33000. 2003. *Antimicrobial Susceptibility Disks*. Remel Apogent. USA. www.remel.com.
- Jawetz, E., J. Melnick, dan E. Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 20. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. pp: 211-212; 214; 216.
- Joklik, WK., HP. Willet., DB. Amos, and CM. Wilfert. 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th ed. Appleton and Lange. California. pp: 111; 405-406.
- Jones, GM., TL. Bailey, and JR. Roberson. 1998. *Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control*. Number 404 – 229. Virginia – Maryland Regional College of Veterinary Medicine. USA.
- Katzung, BG. 2001. *Basic and Clinical Pharmacology*. 9th ed. The MacGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Knappstein, K., G. Suhren, and HG. Walte. 2003. *Prevention of Antibiotic Residue*. Institute for Hygiene and Food Safety Federal Dairy Research Center. Germany.
- Kristyorini, N. 1997. *Deteksi Escherichia coli Dan Staphylococcus aureus Pada Susu Segar yang Beredar Di Wilayah Surabaya*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lindquist, J. 2003. *Differential Media: Hemolytic Reactions and the CAMP Test*. U.W.- Madison.
- Mayer, RJ., and JH. Walker. 1987. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. pp: 194-197.
- Merchant, IA., and RA. Packer. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virologi*. 7th ed. The Iowa State University Press. Iowa. pp: 305-309.
- Meyer, DJ., and J. Harvey. 2002. *Section II: The Gram Positif Cocci. Veterinary Laboratorium Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 2nd ed. W. B. Sannders, Phil Publishing.

- Micromedex, Inc. 1995. *Erythromycin. Veterinary-Intramammary-Local*.
- Mullan, WMA. 2001. *Inhibitor In Milk. Dairy and Food Technology*.
[http://www. Dairy Science and Technology Inhibitor In Milk](http://www.Dairy Science and Technology Inhibitor In Milk).
- Paryati, SPY. 2002. Patogenesis Mastitis Subklinis pada Sapi Perah yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*. Makalah Pengantar Falsafah Sains Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Philpot, WN. 1984. *Mastitis Management*. Babson Bros Co. York Road. U.S.A.
- Prier, JE., JT, Bartola, and H, Friedman. 1975. *Microbiology Laboratories: Quality control of Antibiotic Susceptibility Discs*. 4th ed. University Park Press. pp: 75.
- Quinn, PJ., and MME, Carter. 2002. *Chapter 1: Microbial pathogen and infectious disease. Veterinary microbiology and microbial disease*. Black Well Publishing Company.
- Rollins, DM., and SW. Joseph. 2000. "Staphylococcus Sumary". *Pathogenic Microbiology*. University of Maryland. <http://BSCI 424 Pathogenic Microbiology -- Staphylococcus.htm>.
- Ronald, M. 1988. *Atlas Microbiology; Fundamental and Application*. 2nd ed. Macmillan Publishing Company. pp: 633; 637.
- Samsiyah. 2002. Hubungan antara Sistem Pemeliharaan dan Bentuk Anatomis Putting Sapi Perah terhadap Kejadian Mastitis Di Wilayah Kerja Poskewan Rejotangan Tulungagung. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Stapleton, PD., and PW. Taylor. 2002. *Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus: Mechanism and Modulation*. Science Progress, 85 (1). pp: 57 – 72.
- Stewart, FS., and TSL, Beswick. 1977. *The Staphylococci. Bacteriology, Virology and Immunity for Student of Medicine*. 10th ed. MacMillan Publisher Ltd. pp: 204-205.
- Tikofsky, LL. 2000. *A Comparison of Antibiotic Susceptibility Pattens for Staphylococcus aureus in Organic and Conventional Dairy Herds*. Final Project Report. Organic Farming Research Foundation.

- Todar, K. 2002a. *Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. http://www.bact.wisc.edu/Bact_330/Lecturestaph.htm.
- Todar, K. 2002b. *Staphylococcus*. University of Wisconsin - Madison Department of Bacteriology. http://www.bact.wisc.edu/Bact_330/Lecturestaph.htm.
- U.S. Food and Drug Administration. 2003. "*Staphylococcus aureus*". *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. http://FDA-CFSAN_Bad_Bug_Book_-_Staphylococcus_aureus.htm.
- U.S. Department of Commerce on behalf of the United States. 1998. *Macromolecule -- lactamase, beta- (MOTV)*. http://BMCD_v2_0.htm.
- Wattiaux, MA. 1996. *Mastitis: The Disease and Its Transmission*. Babcock Institute for International Dairy Research and Development.
- Weir, DM. 1978. *Handbook of experimental immunology; Immunology - Laboratory manuals*. 3rd ed. British Library Cataloguing in Publication Data. pp: 2.7.
- Wickerham. 2002. McFarland Turbidity Nephelometer Standards. MICRO METHODS #3: "Preparation and Use of McFarland Standard Test Suspensions". Camp Micro, Inc.
- Yves Le Loir., F. Baron, and M. Gautier. 2002. *Staphylococcus aureus and Food Poisoning*. Institut Nationale de la Recherche Agronomique. France.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian :

Lampiran 2. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

1. Pewarnaan Gram

Koloni bakteri yang dicurigai diambil dengan ose steril diletakkan pada kaca obyek yang sudah ditetesi dengan NaCl fisiologis 0,9%. Dicampur dan diratakan hingga kurang lebih satu sentimeter. Difiksasi diatas api, kemudian diwarnai dengan carbol gentian violet selama satu menit. Tetesi lugol sampai menutupi seluruh hasil fiksasi, kemudian teteskan alkohol ke atasnya untuk melunturkan warna violet. Struktur sel bakteri gram positif mempertahankan warna violet ketika pencucian dengan alkohol sedangkan pada bakteri gram negatif, alkohol dengan mudah membersihkan pewarnaan. Penambahan terakhir pada pewarnaan safranin, bakteri gram negatif mengabsorpsi karakteristik warna merah dalam pewarnaan gram. Diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali untuk mengetahui bentuk dan sifat bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat, bergerombol seperti buah anggur dan berwarna ungu (Kristiyorini,1997; Hopkins and Waggoner, 2003).

2. Uji Katalase

Uji ini untuk menunjukkan adanya enzim katalase. Uji ini untuk membedakan *Staphylococcus* yang bereaksi positif (+) dengan *Streptococcus* yang bereaksi negatif (-) (Todar, 2002b).



Caranya :

Menyiapkan kaca obyek steril, kemudian ditetesi dengan dua tetes larutan H_2O_2 3%. Satu tetes untuk kontrol dan satu tetes untuk uji katalase.

Bakteri dari koloni yang positif gram positif diambil dengan ose dan dicampur dengan satu tetes larutan H_2O_2 3%. Uji Katalase bereaksi positif apabila terbentuk gelembung-gelembung gas (Fox, 2000).

3. Media selektif *Staphylococcus aureus*

Bakteri dari koloni yang positif katalase ditanam pada media selektif *Mannitol Salt Agar* (MSA). Inkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Media ini untuk mengetahui kemampuan staphylococci tumbuh dalam media yang mengandung NaCl 7.5% dan kemampuan memfermentasi mannitol. Indikator pH (phenol red) terdapat dalam Agar, dimana warna Agar berubah dari merah muda menjadi kuning karena hasil fermentasi asam (Boyd, 1995). Hasil positif *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* apabila bakteri dapat tumbuh dan terjadi fermentasi (Fox, 2000).

4. Media diferensial untuk reaksi hemolisis

Bakteri dari koloni yang positif memfermentasi mannitol ditanam pada media diferensial *Blood Agar* (BA) yang mengandung darah domba (Boyd, 1995). Uji ini untuk membedakan antara *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan beta hemolisin (Elsevier, 1984) dengan *Staphylococcus epidermidis* yang tidak (Todar, 2002b). Inkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Hasil positif apabila bakteri tumbuh dan terbentuk daerah bening yang mengelilingi koloni bakteri yang merupakan reaksi bakteri menghemolisis darah (Lindquist, 2003).

5. Uji Koagulase

Uji ini untuk menunjukkan kemampuan *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim koagulase. Uji ini membedakan *Staphylococcus aureus* yang bereaksi positif menggumpalkan plasma kelinci dengan *Staphylococcus epidermidis* yang bereaksi negatif (Boyd, 1995).

Caranya:

Bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* dibuat suspensi dengan cara mengambil 2-3 koloni dari media differensial *Blood Agar* (BA) dimasukkan kedalam 0,1 - 0,5 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) broth. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Plasma kelinci ditambahkan ke dalam suspensi bakteri dengan jumlah sama banyak. Diamkan beberapa menit sampai beberapa jam. Hasil positif *Staphylococcus aureus* ditunjukkan dengan terjadinya penggumpalan. Hasil dilihat tiap 2 jam dan apabila setelah 24 jam tidak terjadi penggumpalan maka hasil dinyatakan *Staphylococci* koagulase negatif (CNS) (Boyd, 1995).

Lampiran 3. Hasil Isolasi, Identifikasi dan Uji Kepekaan *Staphylococcus aureus*

Tabel 3. Hasil Isolasi, Identifikasi dan Uji Kepekaan *Staphylococcus aureus*.

Sam- pel susu	Gram stain	Uji katalase	Media MSA	Media BA	Uji koagu- lase	Uji kepekaan Bakteri					
						P 10 IU	Met 5µg	CN 10µg	E 15µg	C 30µg	TE 30µg
1	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Sam- pel susu	Gram stain	Uji kata- lase	Media MSA	Media BA	Uji Koagu- lase	Uji Kepekaan Bakteri						
						P 10 IU	Met 5µg	CN 10µg	E 15µg	C 30µg	TE 30µg	
9	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	21,71 ^I	22,66 ^S	15,10 ^S	26,74 ^S	21,76 ^S	32,12 ^S
	4	+	+	+	+	+	26,07 ^I	23,41 ^S	17,11 ^S	21,38 ^R	24,54 ^S	28,61 ^S
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1	+	+	+	+	+	21,05 ^I	17,40 ^S	21,68 ^S	21,16 ^R	23,38 ^S	23,10 ^S
	2	+	+	+	+	+	19,60 ^R	20,84 ^S	11,77 ^R	26,18 ^S	25,88 ^S	30,70 ^S
	3	+	+	+	+	+	18,77 ^R	21,46 ^S	17,27 ^S	26,52 ^S	24,33 ^S	31,94 ^S
	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	21,50 ^I	23,43 ^S	15,97 ^S	22,58 ^R	21,87 ^S	30,90 ^S

Sam- pel susu	Gram stain	Uji kata- lase	Media MSA	Media BA	Uji koagu- lase	Uji Kepekaan Bakteri						
						P 10 IU	Met 5 µg	CN 10µg	E 15µg	C 30µg	TE 30µg	
18	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	+	+	+	+	+	29,50 ^S	20,01 ^S	16,22 ^S	24,12 ^S	26,90 ^S	34,08 ^S
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
19	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	2	+	+	+	+	+	18,60 ^R	21,60 ^S	20,99 ^S	26,71 ^S	18,12 ^S	28,18 ^S
	3	+	+	+	+	+	20,70 ^R	23,71 ^S	8,34 ^R	26,60 ^S	23,84 ^S	19,97 ^S
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
20	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

P: Penisilin G; Met: Metisilin; CN: Gentamisin; E: Eritromisin; C: Kloramfenikol; TE: tetrasiklin.
R: Resisten; I: *Intermediate*; S: Sensitif

Lampiran 4. Komposisi Bahan-bahan yang digunakan dalam Penelitian:1. Komposisi *Phospat Buffer Saline* (PBS)

NaCl	8,0	g
KCl	0,2	g
Na ₂ HPO ₄	1,15	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
Aquadest	ad 1000	ml

2. Komposisi *Separating gel* 10%

Acrylamid	3,33	ml
<i>Separating gel buffer</i>	2,50	ml
Aquadest	4,14	ml
APS 10%	30	μl
TEMED	5,0	μl

3. Komposisi *Stacking gel* 4%

Acrylamid	2,0	ml
<i>Stacking gel buffer</i>	2,5	ml
Aquadest	5,4	ml
APS 10%	30	μl
TEMED	5,0	μl

4. Komposisi *Running buffer*

Tris Base	22,75	g
Glysin	14,11	g
SDS	1,0	g
Aquadest	ad 1000	ml

5. Komposisi *Laemmli buffer*

<i>Stacking gel</i>	2.5	ml
SDS	0.2	g
Gliserol	2.0	ml
Bromophenol blue 0.1%	0.1	ml
β-mercaptoethanol	1.0	ml
Aquadest	4.2	ml

6. Komposisi Pewarnaan

Coomassie Brilliant blue R-250	2.5	g
Ethanol	500	ml
Aquades	ad 500	ml
Asam asetat	100	ml

Campur dengan *shaker* selama 2 jam dan saring bila perlu.

Lampiran 5. Perhitungan Fraksi Protein *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan SDS PAGE 10%

$$Rf = \frac{\text{Jarak band dari sumuran}}{\text{Panjang gel sesudah di running}}$$

Panjang gel sesudah running = 84 mm

Marker

Tabel 4. Penentuan Rf dan Berat Molekul Marker

Rf	Berat Molekul (kDa)
0,0119	200
0,0535	116,25
0,0714	97,4
0,1309	66,2
0,2440	45
0,3869	31
0,5595	21,5
0,6428	14,4
0,7321	6,5

Dari data yang didapatkan dari marker, kemudian dimasukkan kedalam persamaan linear dan didapatkan persamaan yaitu:

$$Y = -11,042x^3 + 12,5426x^2 - 5,3414x + 5,3350$$

Y = Log Mr dari Berat Molekul protein marker

X = Rf Marker

Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Sampel *Staphylococcus aureus*:

$$Rf_1 = 0,0654$$

$$Rf_5 = 0,2142$$

$$Rf_2 = 0,1309$$

$$Rf_6 = 0,2380$$

$$Rf_3 = 0,1666$$

$$Rf_7 = 0,2916$$

$$Rf_4 = 0,1904$$

$$Rf_8 = 0,3273$$

$$Rf_9 = 0,4107$$

$$Rf_{11} = 0,6726$$

$$Rf_{10} = 0,4702$$

Harga Rf tersebut dimasukkan dalam persamaan diatas, dan hasilnya di anti log maka didapatkan fraksi protein dengan berat molekul sebagai berikut:

$$Band_1 = 67 \text{ kDa}$$

$$Band_7 = 35 \text{ kDa}$$

$$Band_2 = 55 \text{ kDa}$$

$$Band_8 = 31 \text{ kDa}$$

$$Band_3 = 49 \text{ kDa}$$

$$Band_9 = 28 \text{ kDa}$$

$$Band_4 = 45,5 \text{ kDa}$$

$$Band_{10} = 11,4 \text{ kDa}$$

$$Band_5 = 42 \text{ kDa}$$

$$Band_{11} = 5,3 \text{ kDa}$$

$$Band_6 = 37 \text{ kDa}$$

Tabel 5. Harga Rf dan Berat Molekul Sampel *Staphylococcus aureus*

Rf	Berat Molekul (kDa)
0,0654	67
0,1309	55
0,1666	49
0,1904	45,5
0,2142	42
0,2380	37
0,2916	35
0,3273	31
0,4107	28
0,4702	11,4
0,6726	5,3

Lampiran 6. Hubungan antara Rf (x) dengan Berat Molekul Protein Standar (y) pada Marker Protein *Staphylococcus aureus* (SDS PAGE 10%)

