

DESERTASI

**VARIABILITAS STRAIN *Staphylococcus aureus* YANG
DIISOLASI DARI SUSU SAPI PERAH PENDERITA MASTITIS
DI JAWA TIMUR DENGAN PENDEKATAN GEN PENYANDI
PROTEIN PERMUKAAN BAKTERI DAN
UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIKA**

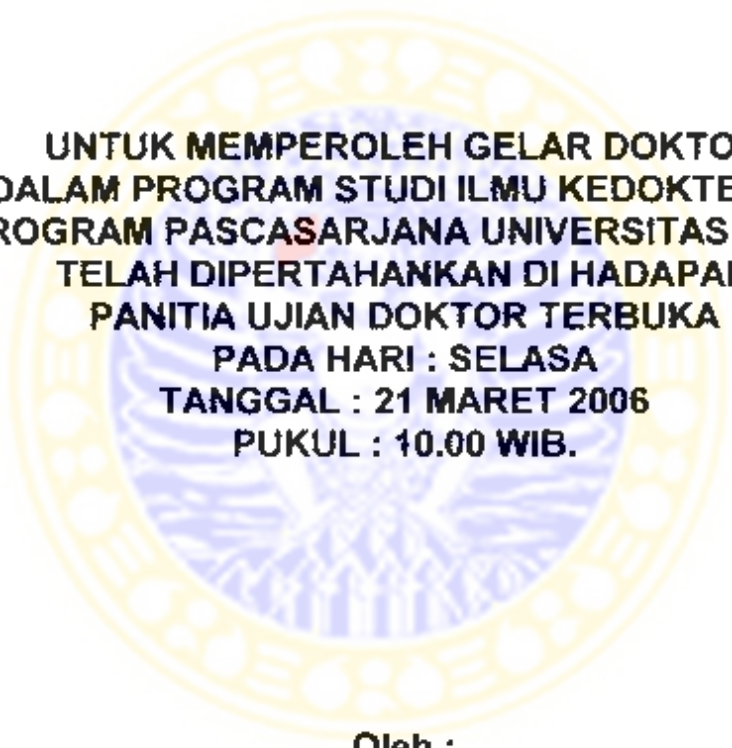


Mustofa Helmi Effendi

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**

**VARIABILITAS STRAIN *Staphylococcus aureus* YANG
DIISOLASI DARI SUSU SAPI PERAH PENDERITA MASTITIS
DI JAWA TIMUR DENGAN PENDEKATAN GEN PENYANDI
PROTEIN PERMUKAAN BAKTERI DAN
UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIKA**

DISERTASI



**UNTUK MEMPEROLEH GELAR DOKTOR
DALAM PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
PADA PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
TELAH DIPERTAHANKAN DI HADAPAN
PANITIA UJIAN DOKTOR TERBUKA
PADA HARI : SELASA
TANGGAL : 21 MARET 2006
PUKUL : 10.00 WIB.**

Oleh :

**Mustofa Helmi Effendi
NIM: 090114555 D**

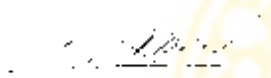
Lembar Pengesahan

**Disertasi ini telah disetujui pada
Tanggal 27 Maret 2006**

Oleh

Ko-Promotor

Promotor



Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK.

Prof. Dr. Sri Subekti, drh., DEA

**Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran**



Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., Sp KG.

Telah diuji pada
Tanggal 16 Februari 2006
PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua Prof Dr Soehartojo Hardjopronjoto, drh, M Sc
Anggota 1. Prof Dr Sri Subekti B.S., drh, DEA
 2. Dr Eddy Bagus Wasito, dr, Sp MK, MS
 3. Prof Kuntoro, dr, MPH, Dr PH
 4. Dr Fedik Abdul Rantam, drh
 5. Dr Hario Puntodewo Siswanto, drh, M App Sc
 6. Dr Surya Rosa Putra, MS
 7. Prof Dr Setiawan Koesdarto, drh, M Sc



Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor :1322/ JO3/ PP/ 2006
Tanggal 23 Februari 2006

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur alhamdulillah adalah ucapan yang pertama kali saya haturkan kepada Allah SWT atas segala rahmat, taufik serta hidayahNya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Selama proses studi, penelitian dan penulisan disertasi ini yang merupakan hasil olah kreasi, inovasi dan ekstrapolasi yang tidak dapat berhasil tanpa bantuan, dorongan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itulah, pada kesempatan ini saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang setulusnya kepada :

Prof Dr Hj Sri Subekti, drh, DEA, atas kesediaan beliau menjadi promotor, di tengah kesibukan yang begitu padat masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan petunjuk dengan kesabaran mulai sebagai Penasihat Akademik sampai menjadi Promotor. Beliau selalu memberikan nasihat baik berupa dukungan moril maupun nasihat yang terkait dengan keilmuan sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini.

Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, Sp MK, selaku ko-promotor, yang diantara kesibukannya yang tinggi beliau tanpa pernah bosan mengingatkan, memotivasi dan memberikan asupan keilmuan dalam rangka pengembangan kematangan dan pendewasaan berpikir untuk penyelesaian berbagai masalah yang terkait dengan proses penulisan disertasi.

Proses penyelesaian tugas akademik dalam rangka program Doktor ini tidak lepas dari peran banyak pihak yang berkaitan. Untuk itu secara jujur dan ikhlas saya menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia, khususnya Menteri Pendidikan Nasional dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan bantuan beasiswa BPPS dalam mengikuti pendidikan doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Airlangga, Prof H Dr Med Puruhito, dr, Sp B TKV, dan juga mantan rektor Universitas Airlangga Prof H Soedarto, dr, DTM&H, PhD, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammad Amin, dr, SpP (K) dan semua asisten direktur yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Selain itu kelancaran proses pengurusan administrasi selama mengikuti pendidikan tidak lepas dari peran seluruh staf administrasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof Dr H Mandojo Rukmo, drg. MSc. SpKG, selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan mantan ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Juliati Hood A., dr, MS, SpPA, FIAC, atas berbagai nasihat dan perhatian yang diberikan kepada saya selama mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof Dr Ismudiono, drh, MS, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan kesempatan mengikuti program pendidikan doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Prof Dr H Yoes Prijatna Dachlan, dr, MSc, yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian di TDC Unair.

Ketua Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Ibu Soetji Prawesthirini, drh, SU, yang memberi ijin untuk melakukan penelitian terutama berkaitan penentuan isolat secara laboratorium. Juga kepada Dr Garry Cores de Vries, drh, MSc, mantan kepala laboratorium Epidemiologi dan Zoonosis FKH Unair yang telah mengizinkan dan mendorong saya untuk mengikuti pendidikan doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Hj Sorini Hartini, drh, (alm) mantan kepala bagian Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang memberikan perhatian penuh terhadap pendidikan saya, secara tulus saya ucapkan banyak terima kasih pada beliau yang dengan penuh kesabaran memberikan banyak nasihat untuk kemajuan pendidikan saya.

Direktur *Institute of Veterinary Food Science – University of Giessen, Germany*, Prof Dr Ewald Usleber yang memberi rekomendasi untuk mendapatkan beasiswa DAAD dan membimbing, mengarahkan dan memberikan fasilitas untuk penelitian biologi molekuler. Juga kepada Dr Omer

Akineden dan Dr Muhammad Hassan atas saran, nasihat dan diskusinya dalam rangka penyelesaian penelitian selama saya berada di Jerman.

Dr A.T. Soelih Estoepangestie, drh, kolega sekaligus dosen Mata Kuliah Penunjang Disertasi yang banyak memberikan masukan keilmuan yang berkaitan dengan *Bovine Mastitis*, beliau juga memberikan banyak informasi mengenai tatacara untuk mendapatkan beasiswa DAAD, yang sangat saya perlukan untuk menyelesaikan penelitian di Jerman.

Dr Hario Puntodewo Siswanto, drh, M App Sc, DEA, kolega dan juga naskah penelitiannya banyak berguna mempertajam pembahasan tentang resistensi antibiotika dalam disertasi saya dan beliau juga merupakan dosen penguji Proposal, Naskah Disertasi, Doktor tahap I.

Dr Angela Mariana Lusastuti, drh, M Si, kolega dan teman diskusi yang menyenangkan, baik sewaktu berada di Jerman maupun dalam aktifitas keseharian di kantor, beliau juga sebagai ketua tim penelitian yang naskah penelitiannya banyak menambah wawasan tentang gambaran perbandingan antara ekspresi protein dari gen penyandi protein permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* dari beberapa lokasi peternakan.

Dadik Raharjo, drh, M Kes, yang memberi masukan dan asupan keilmuan yang berkaitan tentang Mikrobiologi yang menambah kepercayaan saya untuk segera menyelesaikan tugas akademik ini.

H Yoyok Wiyono, drh, karyawan PT. Nestle Indonesia, yang banyak membantu memperkenalkan saya ke pimpinan Koperasi Nongkojajar maupun koperasi Batu, yang bermanfaat untuk mempermudah akses memperoleh

sampel, dan juga menyediakan data yang diperlukan dalam menentukan populasi sapi perah di Jawa Timur.

Ketua Koperasi Sapi Perah Grati, Nongkojajar, Batu dan Wonocolo Surabaya beserta tenaga medisnya yang secara sabar dan tulus membantu mencarikan lokasi dan tempat yang tepat untuk pencarian sampei susu sapi perah penderita mastitis.

Kepada kedua orang tua saya H. Achmad Effendi (alm) dan Ibu Hj. Soemiratning, atas segala bimbingan, arahan dan pemberian semangat dalam menuntut ilmu yang tidak pernah saya peroleh di pendidikan formal mulai saya dilahirkan sampai saya dapat menyelesaikan pendidikan program doktor, semoga Allah SWT selalu melimpahkan kasih sayangNya kepada beliau berdua.

Kedua mertua saya, Bapak Kadari (alm) dan Ibu Siti Mutmainah, yang memberikan doa restu kepada saya sekeluarga, sehingga saya dapat memperoleh ketenangan dan ketentraman dalam menyelesaikan pendidikan doktor ini dengan baik dan lancar.

Kepada ketiga anak saya tercinta : Rizki Izdihar Helmi, Azhar Muhammad Helmi dan Vitra Nuraini Helmi, ayah sangat bersyukur dan bangga mempunyai anak seperti kalian yang selalu dapat menjadi sumber inspirasi dalam kepekatan penyelesaian masalah dan dapat menjadi sumber kebahagiaan dalam mengarungi lautan kehidupan. Saya berharap kalian semua mampu bekerjasama terus menerus dalam menapaki kehidupan di masa mendatang, semoga Allah SWT memberi hidayah kepada kalian semua.

Rasa cinta dan terima kasih yang tidak terhingga kepada istri tercinta, Dra Hj Budiastuti, Apt, yang telah dengan setia mendampingi saya selama lebih dari 17 tahun. Yang paling berkesan dari istri saya adalah sewaktu mendampingi saya dalam rangka penelitian di Jerman dan dilanjutkan dengan melakukan ibadah haji bersama, semoga Allah SWT melimpahkan taufikNya kepada kita sekeuarga.

Semua pihak dan handai taulan serta para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyelesaian disertasi ini.

Sebagai manusia yang tidak bisa lepas dari salah dan khilaf, baik yang disengaja maupun yang tidak disengaja, terutama selama saya menempuh pendidikan S3, maka saya dengan kerendahan hati mohon untuk dimaafkan kesalahan saya tersebut.

RINGKASAN

Variabilitas Strain *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Susu Sapi Perah Penderita Mastitis di Jawa Timur dengan Pendekatan Gen Penyandi Protein Permukaan Bakteri dan Uji Sensitivitas Antibiotika

Mustofa Helmi Effendi

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 cara; 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. Pengolahan industri susu 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 memberikan 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 308 sampel sapi perah yang diambil susunya untuk diperiksa angka prevalensi mastitis. Sampel diambil dari Peternakan Surabaya sebanyak 22 ekor, Peternakan Grati sebanyak 117 ekor, Peternakan Batu sebanyak 71 ekor, dan Peternakan Nongkojajar sebanyak 98 ekor. Dari sampel susu mastitis dilakukan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kriteria yang meliputi bentuk mikroskopis kokus bergerombol, sifat hemolisis tipe β , katalase (+), koagulase (+) dan Gram (+). Penentuan variabilitas strain *Staphylococcus aureus* dengan mempergunakan pendekatan gen penyandi protein permukaan bakteri yang meliputi gen koagulase, gen protein A dan gen *clumping factor* dengan metode PCR, ekspresi gen koagulase, gen protein A dan gen *clumping factor* dengan metode SDS-PAGE dan pendekatan dengan memakai uji sensitivitas antibiotika.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa angka prevalensi mastitis sapi perah dari masing-masing peternakan sapi perah adalah : peternakan sapi perah Surabaya dengan angka prevalensi 86,4%, peternakan sapi perah Grati dengan angka prevalensi 79,5%, peternakan sapi perah Batu dengan angka prevalensi 83,1%, dan peternakan sapi perah Nongkojajar dengan angka prevalensi 82,7%. Isolat *Staphylococcus aureus* yang didapat dari berbagai peternakan tersebut sebagai berikut dari peternakan Surabaya 5 isolat, peternakan Grati 12 isolat, peternakan Batu 6 isolat, dan peternakan Nongkojajar 8 isolat. Dengan pendekatan genotipik memakai berat molekul gen penyandi koagulase didapatkan 4 polimorfisme yaitu besar molekul 600, 680, 740 dan 850 bp; pendekatan genotipik memakai besar molekul gen penyandi protein A didapatkan 2 polimorfisme yaitu besar molekul 110 dan 220 bp; pendekatan genotipik memakai besar molekul gen penyandi *clumping factor*

didapatkan 2 polimorfisme yaitu besar molekul 950 dan 1000 bp. Hasil ekspresi protein dari gen penyandi permukaan bakteri tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kebanyakan isolat dari Surabaya resisten terhadap antibiotika eritromisin dibandingkan dengan isolat dari ketiga peternakan lainnya jika diuji sensitivitas antibiotika terhadap eritromisin, dan juga terdapat perbedaan yang signifikan antara isolat dari Nongkojajar dibandingkan dengan isolat dari ketiga peternakan lainnya jika diuji sensitivitas antibiotika terhadap penisilin dan ampisilin.

Berpijak pada hasil analisis yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen penyandi koagulase (*coa*), gen penyandi protein A (*spa*) dan gen penyandi *clumping factor* (*clfa*) dapat menentukan adanya variabilitas genetik *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis sapi perah di Jawa Timur. Ekspresi protein gen penyandi permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Variabilitas fenotipik berdasarkan uji sensitivitas antibiotika memperlihatkan isolat *Staphylococcus aureus* dari Nongkojajar resisten terhadap penisilin dan ampisilin, sedangkan isolat *Staphylococcus aureus* dari Surabaya resisten terhadap eritromisin. Dengan demikian maka hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar pengobatan yang lebih akurat pada kasus mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

Strains Variability of *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk of Cows with Mastitis in East Java through Encoding Genes for Surface Protein Approaching and Antibiotic Susceptibility

Mustofa Helmi Effendi

Mastitis is an inflammation of the udder and is common in dairy herds which 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 to 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 *Staphylococcus 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 *Staphylococcus 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 *Staphylococcus aureus* IMI. The knowledge of the sources of *Staphylococcus aureus* would suggest that total eradication is not currently possible, especially because *Staphylococcus aureus* produce virulence factors. Therefore, investigation in molecular biology level on *Staphylococcus aureus* should be done to solve mastitis problems.

The experiment used 308 cows that were collected for prevalence rate of mastitis. Surabaya dairy herd, Grati dairy herd, Batu dairy herd, and Nongkojajar dairy herd were 22 samples, 117 samples, 71 samples, and 98 samples, respectively. From mastitic milk samples could be identified *Staphylococcus aureus* isolates by using criteria such as : Staphylococci are perfectly spherical cells about 1 micrometer in diameter and grow in clusters, β hemolysis, coagulase (+), catalase (+) and Gram (+). Determination of strains variability of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis in East Java was done through approaching of encoding genes for surface protein (coagulase, protein A and clumping factor) by PCR, proteins gene expression by SDS-PAGE electrophoresis and antibiotic susceptibility.

The result showed that prevalence rate of bovine mastitis : in Surabaya, Grati, Batu and Nongkojajar dairy herd were 86,4%, 79,5% 83,1%, and 82,7%, respectively. Whereas the number of isolates of *Staphylococcus aureus* were 5, 12, 6, and 8 isolates each from Surabaya, Grati, Batu and Nongkojajar dairy herd, respectively. Molecular size of encoding gene of coagulase are 4 polymorphisms : 600 bp, 680 bp, 740 bp and 850 bp. Molecular size of encoding gene of protein A are 2 polymorphisms : 110 bp and 220 bp. Molecular size of encoding gene of clumping factor are 2 polymorphisms: 950 bp and 1000 bp. The proteins expression of gene for surface protein showed that there were no significant different on band pattern. The majority of isolates from Surabaya dairy herd were resistant against erythromycin compared with others, however there were significant different on penicillin and ampicillin antibiotic susceptibility between isolates from Nongkojajar dairy herd compared with others.

Based on these results can be concluded that the encoding genes of coagulase, protein A and clumping factor can be used to determine there are strain variability on *Staphylococcus aureus* which were isolated from bovine mastitis in East Java. Environmental factors have no effect on protein expression of encoding genes for surface protein. The majority isolates *Staphylococcus aureus* from Surabaya dairy herd were resistant against erythromycin antibiotic

and isolates *Staphylococcus aureus* from Nongkojajar dairy herd were resistant against penicillin and ampicillin antibiotics. Therefore, these results can be used as a reference for more accurate therapy on Staphylococcal mastitis.



ABSTRACT

Strains Variability of *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk of Cows with Mastitis in East Java through Encoding Genes for Surface Protein Approaching and Antibiotic Susceptibility

Mustofa Helmi Effendi

The purpose of this research was to find out the presence of strains variability in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis in East Java. Taxonomically, the genus *Staphylococcus* is in the bacterial family *Micrococcaceae*. Staphylococci are perfectly spherical cells about 1 micrometer in diameter. They grow in clusters because staphylococci divide in two planes. The catalase test is important in distinguishing streptococci (catalase-negative) from staphylococci, which are vigorous catalase-producers. *Staphylococcus aureus* forms a fairly large yellow colony on rich medium, *Staphylococcus epidermidis* has a relatively small white colony. *S. aureus* is often hemolytic on blood agar, *Staphylococcus epidermidis* is non hemolytic. Staphylococci are facultative anaerobes that grow by aerobic respiration or by fermentation that yields principally lactic acid. *S. aureus* can grow at a temperature range of 15 to 45 degrees and at NaCl concentrations as high as 15 percent. Nearly all strains of *Staphylococcus aureus* produce the enzyme coagulase, however nearly all strains of *Staphylococcus epidermidis* lack this enzyme.

By encoding genes for surface protein of *Staphylococcus aureus* approaching showed confirmed appearance with polymorphisms. In these results showed that encoding gene for coagulase there are four polymorphisms with molecular size 600, 680, 740 and 850 bp; encoding gene for protein A there are two polymorphisms with molecular size 110 and 220 bp; and encoding gene for clumping factor there are two polymorphisms with molecular size 950 and 1000 bp. Protein expression of *coa*, *spa* and *clfA* genes of *Staphylococcus aureus* isolates from four dairy herds showed there are no different on band pattern by using SDS-PAGE electrophoresis.

Antibiotic susceptibility showed that there are two isolates of *Staphylococcus aureus* which resistance for antibiotic. The majority of isolates of *Staphylococcus aureus* from Surabaya dairy herd were resistance against erythromycin and isolates of *Staphylococcus aureus* from Nongkojajar dairy herd were resistance against penicillin and ampicillin.

Based on these results, it is suggested that strain variability of *Staphylococcus aureus* may indicate relative importance in mastitis control, especially to give accurate therapy on cows with staphylococcal mastitis.

Key words : *Staphylococcus aureus*, mastitis, encoding genes, surface protein, antibiotic susceptibility

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PRASYARAT GELAR	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN	xi
SUMMARY	xiv
ABSTRACT	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Mastitis	11
2.1.1 Sumber Mikroorganisme Penyebab Mastitis	14
2.1.2 Dampak Ekonomi Mastitis	17
2.1.3 Pengendalian Mastitis dan Pengobatan	19
2.1.4 Proses Terjadinya Mastitis	23
2.1.5 Tinjauan Sistem Imun Hospes Terhadap Mastitis	25
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.2.1 Faktor Virulensi <i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.2.2 Ekspresi dan Regulasi dari Faktor Virulensi	44
2.2.3 Pengaruh Faktor Lingkungan Terhadap Ekspresi Gen Penyandi Faktor Virulensi	47
2.3 Penggunaan Antibiotika di Bidang Peternakan	48
2.3.1 Antibiotika Untuk Bakteri Gram positif	49
2.4 Resistensi Terhadap Antibiotika	58
2.4.1 Dasar Genetik Untuk Resistensi Terhadap Antibiotika	64
2.5 Pengujian Resistensi Terhadap Antibiotika	67
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	69
3.1 Kerangka Konseptual	69
3.2 Bagan Kerangka Konseptual	73
3.3 Hipotesis.	74

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	75
4.1 Rancangan Penelitian	75
4.2 Populasi, Metode Sampling, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	75
4.3 Variabel Penelitian	77
4.4 Bahan Penelitian	79
4.5 Prosedur Penelitian	80
4.6 Analisis Data	86
4.7 Lokasi Penelitian	86
4.8 Kerangka Operasional Penelitian	88
BAB 5 HASIL PENELITIAN	89
5.1 Prevalensi Mastitis Sapi Perah	90
5.2 Identifikasi Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>	92
5.3 Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> dengan pendekatan genotipe gen penyandi protein permukaan bakteri.	93
5.4 Karakterisasi <i>Staphylococcus aureus</i> melalui ekspresi gen penyandi Protein permukaan bakteri.	95
5.5 Karakterisasi <i>Staphylococcus aureus</i> melalui metode <i>disk diffusion</i> untuk uji sensitivitas antibiotika.	97
BAB 6 PEMBAHASAN	104
6.1 Prevalensi Mastitis Sapi Perah	104
6.2 Identifikasi Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>	109
6.3 Identifikasi Molekuler Gen Penyandi Permukaan Protein Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	111
6.4 Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Permukaan Bakteri	115
6.5 Uji Sensitivitas Antibiotika pada <i>Staphylococcus aureus</i>	124
6.6 Hasil Temuan	130
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	132
7.1 Kesimpulan	132
7.2 Saran	132
DAFTAR PUSTAKA	134
Lampiran	148

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Ambing sapi perah yang mengalami mastitis sehingga tampak pembengkakan dan kemerahan.	11
Gambar 2.2 Hasil uji CMT positif pada <i>paddle C</i> .	13
Gambar 2.3 Pengobatan mastitis pada sapi perah dengan sistem <i>intra Mammary</i>	21
Gambar 2.4 Proses terjadinya mastitis pada kelenjar susu sapi perah	24
Gambar 2.5 Gambaran mikroskop elektron <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Gambar 2.6 Proses pembelahan <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Gambar 2.7 Faktor virulensi yang dipunyai oleh <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Gambar 2.8 Patogenesis infeksi oleh <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Gambar 2.9 Sistem <i>accessory gene regulator</i> pada <i>Staphylococcus aureus</i> .	46
Gambar 2.10 Mekanisme kerja beberapa antibiotika	53
Gambar 2.11 Penghambatan antibiotika betalaktam pada sintesis dinding sel	55
Gambar 2.12 Proses perpindahan gen resistensi terhadap antibiotika	60
Gambar 2.13 Perpindahan resistensi antibiotika pada bakteri melalui plasmid	61
Gambar 2.14 Resistensi antibiotika melalui mutasi kromosom dalam bakteri	62
Gambar 2.15 Mekanisme resistensi utama antibiotika betalaktam	63
Gambar 2.16 Proses resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika betalaktam	65
Gambar 2.17 <i>Staphylococcal Chromosome Cassette mec (SCCmec)</i>	66
Gambar 2.18 Interpretasi Hasil Metode Kirby Bauer Disk Diffusion	68
Gambar 4.1 Pengambilan susu sebagai sampel untuk uji CMT	77
Gambar 4.2 Uji Katalase	81
Gambar 5.1 Sapi penderita mastitis klinis dari peternakan Batu	90
Gambar 5.2 Susu yang diambil dari sapi penderita mastitis klinis dan subklinis	91
Gambar 5.3 a. Mikroskopis kokus dengan pewarnaan Gram positif, b. Hasil uji koagulase	92
Gambar 5.4 a. Hasil uji hemolisis β , b. Hasil uji fermentasi pada MSA	92
Gambar 5.5 Gen penyandi koagulase	94
Gambar 5.6. Gen penyandi <i>clumping factor</i>	94
Gambar 5.7 Gen penyandi protein A	95
Gambar 5.8 Ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dengan inkubasi 37 ⁰ C.	96
Gambar 5.9 Ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dengan inkubasi 42 ⁰ C	96

Gambar 5.10 Zona resisten, zona <i>intermediate</i> dan zona sensitif pada uji sensitivitas antibiotika metode <i>disk diffusion</i> .	97
Gambar 5.11 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika eritromisin.	98
Gambar 5.12 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika eritromisin.	98
Gambar 5.13 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika <i>ciproxin</i> .	99
Gambar 5.14 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika <i>ciproxin</i> .	99
Gambar 5.15 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika tetrasiklin.	100
Gambar 5.16 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika tetrasiklin.	100
Gambar 5.17 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika <i>cephalexin</i> .	101
Gambar 5.18 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika <i>cephalexin</i> .	101
Gambar 5.19 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika ampisilin.	102
Gambar 5.20 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika ampisilin.	102
Gambar 5.21 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika penisilin.	103
Gambar 5.22 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), <i>intermediate</i> (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika penisilin.	103

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Differensiasi Genus <i>Staphylococcus</i> yang bersifat zoonosis	38
Tabel 2.2	Beberapa antibiotika yang efektif terhadap bakteri Gram positif	51
Tabel 5.1	Prevalensi Mastitis pada Sapi Perah di Empat Lokasi Peternakan Sapi Perah	91
Tabel 5.2	Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>	93
Tabel 5.3	Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> dengan pendekatan genotipe gen penyandi protein permukaan bakteri.	93



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Faktor Virulensi <i>Staphylococcus aureus</i> berupa adhesin	148
Lampiran 2 : Faktor Virulensi <i>Staphylococcus aureus</i> yang berupa toksin dan Invasin	149
Lampiran 3 : Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Ampisilin	150
Lampiran 4 : Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Ciproxin	152
Lampiran 5 : Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Cephalexin	154
Lampiran 6: Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Eritromisin	156
Lampiran 7: Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Penisilin	157
Lampiran 8: Analisis Statistik Uji Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap antibiotika Tetrasiklin	159
Lampiran 9: Tehnik Epidemiologi Molekuler yang Diaplikasikan pada Agen Penyebab <i>Staphylococcus aureus</i>	161
Lampiran 10: Analisis Regresi Karakterisasi Protein Permukaan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan suhu inkubasi 37° C	162
Lampiran 11: Analisis Regresi Karakterisasi Protein Permukaan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan suhu inkubasi 42° C.	163
Lampiran 12: Data Produksi Susu di Jawa Timur	164

DAFTAR SINGKATAN

agr	accessory gene regulator
ANOVA	analysis of varians
AIP	auto inducing peptide
BM	berat molekul
bp	base pair
CMT	California Mastitis Test
clfA gene	clumping factor A gene
CNS	Coagulase Negative Staphylococci
coa gene	coagulase gene
DNA	deoxyribo nucleic acid
ET	epidermolytic toxin
ECM	extra celuller matrix
Ig	Immunoglobulin
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IVET	in vivo expression technology
IMI	Intramammary Infection
IL	Interleukin
kD	Kilo Dalton
MHC	Major Histocompatibility
MRSA	Methicillin resistant Staphylococcus aureus
MSA	Manitol Salt Agar
MSCRAMM	microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
ORF	Open Reading Frame
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Poly Morphonuclear
PBP	Penicillin Binding Protein
PBS	Phenol Buffer Saline
RNA	ribo nucleic acid
RFLP	restriction fragment lenght polymorphism
sar	staphylococcal accesory regulator
SCC	somatic cell count
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SE	staphylococcal enterotoxin
spa gene	staphylococcal surface protein A gene
STM	signature tagged mutagenesis
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal Chromosome Cassette <i>mec</i>
TE	Tris-HCl EDTA
TSS	toxic shock syndrome
TSST	toxic shock syndrome toxin
TNF	Tumor Necrotic Factor
TH	T Helper
VCAM	Vascular Adhesion Molecule

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Usaha untuk meningkatkan produksi susu telah dilaksanakan oleh pemerintah dan masyarakat peternak sapi perah, 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. Usaha peningkatan produksi susu harus juga diimbangi dengan peningkatan kualitas susu dan keamanannya.

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 bakteri, baik bakteri yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan manusia, bakteri penyebab kerusakan susu maupun yang diisolasi dari mastitis (Hurley and Morin, 2003).

Penyakit radang ambing yang dikenal sebagai mastitis merupakan masalah utama dalam tata laksana usaha peternakan sapi perah karena sangat merugikan peternak sapi perah. Mastitis yang 80 – 90% disebabkan karena bakteri, menyebabkan penurunan kuantitas produksi susu dalam jumlah besar, juga berpengaruh terhadap penurunan kualitas susu yang dihasilkan, yang

secara langsung ataupun tidak langsung akan merugikan konsumen dan industri pengolah susu (Jones, 1998). Berdasarkan hal tersebut, harus dilakukan pengkajian yang mendalam tentang faktor yang terkait dengan terjadinya mastitis untuk dilakukan pengendalian untuk mengurangi kerugian petemak, industri pengolahan susu dan khususnya masyarakat konsumen.

Mastitis adalah peradangan jaringan interna kelenjar susu atau ambing dengan berbagai penyebab, derajat keparahan, lama penyakit dan akibat penyakit yang sangat beragam. Secara garis besar mastitis terbagi atas mastitis klinis dan mastitis subklinis (Morin and Hurley, 2003). 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 menampilkan perubahan yang nyata pada ambing dan susu yang dihasilkannya, hanya produksi susu turun sehingga petemak kerap kali terlambat menyadari. Untuk itulah diperlukan pengendalian penyakit mastitis yang melibatkan pengkajian dari berbagai aspek.

Proses terjadinya mastitis senantiasa dikaitkan dengan tiga faktor yaitu sapi, penyebab peradangan dan lingkungan. Resiko terjadinya mastitis terletak pada ketidakseimbangan ke tiga faktor tersebut (Jones, 1998). Mastitis terjadi sebagian besar akibat masuknya bakteri patogen melalui lubang puting susu, kemudian berkembang di dalamnya lalu terjadilah mastitis (Hurley and Morin, 2003).

Walaupun data mengenai kasus mastitis di Indonesia telah banyak dilaporkan, namun tingginya kasus mastitis subklinis sering dikaitkan dengan

faktor-faktor yang mempermudah terjadinya mastitis, seperti luka lecet pada ambing akibat pemerahan yang salah dan kasar, serta 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 (Sudarwanto, 1999).

Kerugian ekonomi secara umum yang diakibatkan mastitis subklinis, meliputi penurunan produksi, penurunan mutu susu, pembuangan susu, biaya perawatan dan pengobatan, pengafkiran temak lebih awal serta pembelian sapi perah baru. Penurunan produksi susu akibat mastitis sangat bervariasi antara 10 – 40% (Department of Animal Science, 2003).

Kerugian ekonomi akibat turunnya kualitas susu asal penderita mastitis subklinis lebih banyak disoroti dari aspek teknologinya. Kualitas susu turun ditandai dengan perubahan kandungan susu seperti turunnya kadar laktosa, lemak, dan kasein (Department of Animal Science, 2003). Di samping susunan susu dan pH susu meningkat, daya menggumpal dan aktifitas plasmin juga turut meningkat. Akibat lain adalah susu menjadi tidak stabil bila dipanaskan, produk susu pasteurisasi berkualitas rendah, dan cita rasanya menurun (Hurley and Morin, 2003).

Untuk mengurangi kerugian ekonomi tersebut perlu dilakukan pengendalian mastitis secara tepat dan efisien. Pengendalian mastitis yang sering dilakukan oleh para peternak di Jawa Timur adalah sebagai berikut : mencuci tangan sebelum pemerah dengan larutan desinfektan; melakukan pemerahan dengan baik dan benar tanpa bahan pelicin sampai tuntas; 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 (Sudarwanto, 1999).

Staphylococcus aureus adalah penyebab mastitis yang penting dalam peternakan sapi perah. Ambing sapi perah yang terinfeksi merupakan sumber utama penyakit yang dapat menularkan *Staphylococcus aureus* ke sapi perah lainnya dalam peternakan (Roberson, 1999). Pencegahan terhadap penularan patogen dari sapi perah ke sapi perah lainnya dapat menurunkan angka kejadian mastitis. Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah sangat sulit untuk dikontrol oleh pengobatan (Jones, 1998), dan angka kejadian mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* merupakan angka kejadian tertinggi (Morin and Hurley, 2003) . Keberhasilan pengendaliannya hanya melalui pencegahan infeksi baru, pengafkiran sapi terinfeksi *Staphylococcus aureus*. Mikroorganisme ini mungkin melakukan penetrasi ke lubang puting selama pemerahan dan berkembang menjadi infeksi baru

Dalam usaha memanfaatkan dan meningkatkan potensi susu sebagai sumber makanan bermutu tinggi, maka diperlukan strategi yang efektif dan rasional untuk mengontrol infeksi pada ambung sapi perah. Identifikasi gen virulensi yang terkait dengan mastitis oleh *Staphylococcus aureus* merupakan sebuah langkah penting dalam memahami proses terjadinya penyakit mastitis tersebut. Hal ini disebabkan gen virulensi *Staphylococcus aureus* sangat terkait dengan faktor lingkungan, baik lingkungan makro maupun lingkungan mikro (Wisell, 2000) dan mastitis disebabkan *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab terbesar terjadinya kasus mastitis (Morin and Hurley, 2003).

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 terutama dalam sistem pengobatan mastitis tanpa adanya dukungan data yang lengkap mengenai resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika yang diisolasi dari mastitis.

Untuk lebih memahami tentang agen penyakit *Staphylococcus aureus*, maka diperlukan pendalaman pada tingkat subspecies untuk melihat sumber penyakit dan pola penyebarannya dalam populasi. 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.

Epidemiologi molekuler adalah penggunaan tehnik molekuler untuk studi epidemiologi (Zadoks, 2002). Tehnik molekuler dapat diaplikasikan pada penelitian tentang hospes maupun agen penyakitnya. Dalam disertasi ini penelitian difokuskan pada agen penyakit *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis di Jawa Timur. Ketika diaplikasikan dalam epidemiologi penyakit infeksi, maka tujuan utama dari epidemiologi molekuler termasuk di dalamnya adalah identifikasi mikroorganisme, gen yang bertanggungjawab untuk karakteristik spesifik seperti faktor virulensi dan memonitor patogen yang resisten terhadap antibiotika.

Sejumlah tehnik molekuler untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies dan subspecies sangat banyak (Zadoks, 2002). Tehnik molekuler dapat diklasifikasi sebagai genotipik atau fenotipik, tergantung dari tujuan pendeteksian itu sendiri (lampiran 9). Jika pendeteksian untuk hasil ekspresi protein gen maka merupakan fenotipik, tetapi jika pendeteksian untuk material genetik maka merupakan genotipik. Uji kepekaan antibiotika merupakan fenotipik (Zadoks, 2002), sedangkan untuk genotipik yang digunakan dalam penelitian ini adalah gen penyandi koagulase (Viera-da-Motta *et al.*, 2001), gen penyandi protein A (Zadoks, 2002), dan gen penyandi *clumping factor* (Akineden *et al.*, 2001).

1.2 Rumusan Masalah

Dalam usaha untuk mengidentifikasi adanya variabilitas strain *Staphylococcus aureus* yang diisolasi susu penderita mastitis pada sapi perah

di Jawa Timur tersebut dengan pendekatan genotipik dan fenotipik, maka rumusan masalah yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

Apakah ada variabilitas strain *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis di Jawa Timur?

Dari pokok permasalahan tersebut, dapat dibuat beberapa submasalah seperti tersebut di bawah ini:

1. Apakah ada perbedaan berat molekul gen penyandi koagulase *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar?
2. Apakah ada perbedaan berat molekul gen penyandi *clumping factor* *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar?
3. Apakah ada perbedaan berat molekul gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar?
4. Apakah ada perbedaan pola ekspresi protein gen penyandi koagulase, *clumping factor* dan protein A *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar?

5. Apakah ada perbedaan resistensi *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengkaji peran lingkungan makro seperti perbedaan peternakan sapi perah pada dataran tinggi dengan dataran rendah, perbedaan suhu dan kondisi geografis serta peran lingkungan mikro seperti kandungan kimiawi susu, pH susu, kerapatan bakteri terhadap timbulnya variabilitas strain *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis pada sapi perah di Jawa Timur.

Tujuan Khusus

1. Identifikasi adanya perbedaan berat molekul gen penyandi koagulase *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.
2. Identifikasi adanya perbedaan berat molekul gen penyandi *clumping factor* *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.

3. Identifikasi adanya perbedaan berat molekul gen penyandi protein A *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.
4. Karakterisasi adanya perbedaan pola ekspresi protein gen penyandi koagulase, *clumping factor* dan protein A *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.
5. Membuktikan adanya perbedaan resistensi *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat Teoritis

1. Memberikan kontribusi informasi dalam menyebarkan data tentang prevalensi mastitis pada sapi perah di Jawa Timur.
2. Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengungkap variabilitas genetik *Staphylococcus aureus*.
3. Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengungkap ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dengan menggunakan suhu inkubasi yang berbeda.
4. Memberikan kontribusi informasi tentang peta resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika di Jawa Timur.

Manfaat Praktis

Dengan ditemukan perbedaan pola resistensi antibiotika pada *Staphylococcus aureus* di Jawa Timur, maka dapat bermanfaat sebagai dasar penentuan pengobatan yang lebih akurat dan penyempurnaan dalam tatalaksana pengendalian mastitis pada sapi perah yang disebabkan *Staphylococcus aureus* di Jawa Timur.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mastitis

Mastitis adalah sebuah respon peradangan dari jaringan ambing sapi perah terhadap serangan bakteri, kimiawi, suhu atau fisik (gambar 2.1). Mastitis dapat bersifat infeksius yaitu yang disebabkan oleh mikroorganisme atau non infeksius yaitu yang berupa luka fisik pada kelenjar susu. Respon peradangan terdiri dari peningkatan protein darah dan sel darah putih dalam jaringan kelenjar susu dan di susu. Tujuan dari respon tersebut adalah untuk merusak penyebab iritasi, memperbaiki kerusakan jaringan dan mengembalikan ambing ke fungsi normal (Department of Animal Science, 2003).



Gambar 2.1 Ambing sapi perah yang mengalami mastitis sehingga tampak pembengkakan dan kemerahan. (Department of Veterinary Science, 2005)

Mastitis merupakan penyakit yang berpengaruh besar dalam peternakan sapi perah. Mastitis tersebut terkait dengan masalah ekonomi, produktivitas, perdagangan internasional dan masalah kesejahteraan hewan yang membuat penyakit ini penting dalam industri persusuan di bidang pertanian (Owen *et al.*, 2001).

Mastitis 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 puting. Mastitis kontagiosa sering berbentuk mastitis subklinis. Infeksi ditularkan melalui peralatan pemerahan, termasuk dari tangan pemerah. Sebagian besar 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. Sebagian besar bakteri penyebab mastitis lingkungan adalah bakteri coliform, *Streptococcal sp.* dan *Pseudomonas sp.* (Morin and Hurley, 2003).

Mastitis sering terjadi secara subklinis sehingga tidak tampak perubahan pada susu maupun pada ambing, tetapi terjadi peningkatan *somatic cell count* (SCC) (Roberson *et al.*, 1994). SCC merujuk pada *polymorphonuclear*

neutrophilic leukosit (PMN) dan sel-sel lainnya yang bergerak ke kelenjar susu dalam jumlah besar selama proses infeksi. Keberadaan SCC dalam ambing yang disekresikan ke dalam susu menyebabkan perubahan kandungan susu. Penurunan SCC menampakkan perbaikan kualitas susu yang dihasilkan, lama penyimpanan dan menghasilkan keju yang berkualitas bagus (Green, 2003). Keberadaan SCC dalam jumlah besar di dalam susu mengindikasikan adanya infeksi mastitis baik yang klinis maupun subklinis, dan terdeteksi dengan menggunakan alat *California Mastitis Test (CMT)* (gambar 2.2).



Gambar 2.2 Hasil uji CMT positif pada *paddle C*.
(Department of Veterinary Science, 2005)

Staphylococcus aureus memproduksi beberapa faktor virulensi yang dapat merusak kelenjar susu. Leukosit bergerak ke daerah radang untuk menghentikan infeksi. Pada awalnya bakteri merusak jaringan dalam puting dan kelenjar sistem dalam kuartir ambing, kemudian masuk ke dalam sistem saluran dan membentuk kantung 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*.

Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* sulit dikontrol hanya dengan pengobatan antibiotika saja. Suksesnya pengontrolan diperoleh 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 (Jones, 1998).

2.1.1 Sumber Mikroorganisme Penyebab Mastitis

Mastitis dapat disebabkan oleh bakteri patogen yang berasal dari lingkungan dan kontak individu. Mastitis kontagiosa terjadi dengan mikroorganisme yang disebarkan dari kuarter yang terinfeksi ke kuarter lainnya yang sering terjadi pada proses pemerahan susu. Mikroorganisme dari lingkungan umumnya merupakan mikroorganisme 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 umumnya disebabkan oleh bakteri yang ada dalam berbagai lokasi pada sapi. Mastitis yang disebabkan bakteri dimulai dari ambing sapi yang terkena infeksi dan menyebar ke dalam alveoli kelenjar susu.

Beberapa mikroorganisme penyebab mastitis mempunyai patogenitas yang berbeda. Patogen dapat menyebar dari lokasi utama yang berbeda, dan berkembang dalam lingkungan berbeda, hal ini menyebabkan keakutan dan keparahan dari infeksi berbeda.

Mastitis kontagiosa didefinisikan sebagai mastitis yang ditransmisikan langsung dari sapi ke sapi lainnya (Erskine *et al.*, 2002). Angka insidensi dari mastitis kontagiosa tergantung dari jumlah dan spesies mikroorganisme yang menyerang sapi perah dan juga tergantung pada hambatan fisik dan sistem kekebalan yang dimiliki oleh sapi perah. Meskipun ada perbedaan spesies 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 *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae* yang terutama 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 dan sangat meningkatkan kepekaan puting susu oleh paparan 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. Ketika antibiotika golongan beta laktam diberikan ke dalam ambung yang mastitis klinis hampir selalu memberikan kesembuhan terutama dengan penyebab *Streptococcus agalactiae*, tetapi jarang sembuh bila infeksi dengan penyebab *Staphylococcus aureus* (Matthews et al., 1994).

2.1.1.2 Mastitis Lingkungan

Mikroorganisme lingkungan yang merupakan penyebab utama mastitis lingkungan adalah bakteri gram negatif; termasuk di dalamnya adalah *coliforms* dan streptococci lingkungan. Bakteri gram negatif terdiri dari *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus* dan *Actinomyces pyogenes* (Bramley et al., 1996). *Streptococcus uberis* dan *E. coli* paling sering sebagai penyebab mastitis lingkungan. Umumnya infeksi yang disebabkan oleh *coliforms* menghasilkan mastitis akut dan berlangsung kurang dari 7 hari (Barker et al., 1998).

Lokasi patogen yang utama adalah pada lingkungan sekitar sapi perah. Agen patogen mengalami multiplikasi dalam material alas organik (misalnya jerami dan serbuk gergaji). Mastitis terjadi pada umumnya di peternakan yang mengandangkan sapi perah di awal laktasi dan patogen ini dapat menyebabkan mastitis subklinis. Mastitis klinis terjadi jika terdapat *endotoxaemia* sebagai

penyebab peningkatan temperatur tubuh dan pengurangan produksi susu (Owens *et al.*, 2001).

Infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus uberis* pada umumnya dapat diobati dengan baik tetapi jika disebabkan oleh *E. coli* maka langkah awal yang penting adalah memberikan perawatan yang mendukung untuk mengeliminasi *endotoxaemia* dan jika ini dilakukan maka kesembuhan akan dapat dicapai (Sears and Belschner, 1998).

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

2.1.2 Dampak Ekonomi Mastitis

Mastitis adalah penyakit yang paling banyak mengeluarkan biaya pada peternakan sapi perah (Jaenicke *et al.*, 1999). Biaya yang terkait dengan penyakit tersebut termasuk: susu yang terbuang, pengafkiran dini, biaya perawatan dan pengobatan oleh dokter hewan dan yang terpenting yaitu penurunan kuantitas dan kualitas 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 kuartar pada individu sapi perah (Jones *et al.*, 1984).

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

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

Bila kerugian ekonomi yang timbul 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 yang dikeluarkan 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

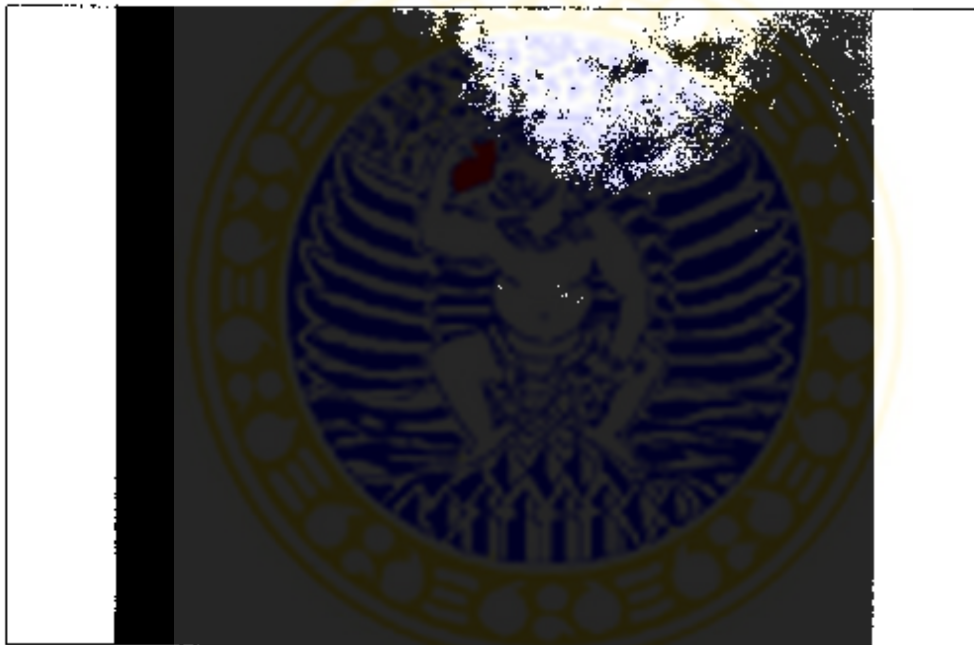
Mastitis adalah suatu peradangan pada ambing yang menyebabkan kerugian ekonomi penting. Penyakit ini sulit dibasmi tetapi dapat dikurangi menjadi tingkat rendah dengan cara sistem manajemen yang baik pada peternakan sapi perah. Dari beberapa penyebab mastitis hanya infeksi dan peradangan yang disebabkan oleh bakteri yang terpenting. Walaupun bakteri, jamur, ragi dan mungkin virus dapat menyebabkan infeksi dan peradangan pada ambing, tetapi agen yang utamanya adalah bakteri. Bakteri yang paling umum adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* dan *Escherichia coli* meskipun spesies yang lain juga dapat menyebabkan mastitis (Bramley *et al.*, 1996). Mastitis terjadi ketika puting susu sapi terpapar oleh patogen yang menembus saluran puting susu dan menyebabkan infeksi dan peradangan di dalam satu atau lebih kuartir ambing (Fox *et al.*, 1995). Keadaan suatu infeksi dan peradangan bervariasi, paling umum berupa mastitis subklinis. Secara khas pada agen penyebab *Escherichia coli*, infeksi dan peradangan sering lebih akut dan terjadi *endotoxaemia* umum dengan temperatur badan meningkat, hilangnya nafsu makan sapi perah dan sapi akan mati kecuali jika pengobatan yang mendukung diberikan. Pengobatan yang efektif adalah pemberian antibiotika melalui saluran puting susu (gambar 2.3). Hal ini hampir selalu memperbaiki penyakit yang klinis dan sering juga menyembuhkan infeksi dan peradangan yang disebabkan bakteri (Oliver *et al.*, 1992).

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

Cara yang paling efektif mengurangi paparan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* dan *Streptococcus dysgalactiae* adalah dengan mencelupkan atau penyemprotan puting susu dengan obat pembasmi hama yang langsung seketika setelah pemerahan susu (Jones, 1998). Sejumlah produk obat pembasmi hama yang tersedia dan baik adalah 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 puting susu. Praktek seperti mencuci ambing dengan obat pembasmi hama, pembilasan peralatan pemerahan susu, pembilasan punggung akan juga mengurangi paparan tetapi efeknya lebih kecil dibanding puting susu yang dicelupkan sebab tidak mempengaruhi kolonisasi mikroorganisme pada puting susu dan saluran. Untuk memelihara pada

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

Adanya pertahanan tidak spesifik yang disajikan oleh sistem kompleks biokimiawi yang mencakup enzim dan unsur susu yang lain merupakan pelengkap pertahanan seluler dan humoral untuk mencegah terjadinya mastitis (Nickerson, 1988); tetapi jika terjadi kasus mastitis maka kesembuhan secara spontan pada kasus mastitis jarang terjadi.



Gambar 2.3 Pengobatan mastitis pada sapi perah dengan sistem *intra Mammary* (Pyorala, 2002)

Saluran puting susu yang sehat sangat efektif mencegah masuknya patogen ke dalam ambing dan merupakan penghalang alami melawan infeksi, dan tidak hanya bertindak sebagai suatu penghalang fisik melawan penetrasi

mikroorganisme tetapi juga menghalangi pertumbuhan bakteri dengan pengeluaran zat dari lapisan saluran (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 namun jika tidak, infeksi pada umumnya terjadi (Owens *et al.*, 2001).

Penggunaan antibiotika dalam pengobatan mastitis terbukti merupakan suatu kemajuan utama dalam pengendalian mastitis pada sapi perah. Pemberian antibiotika melalui saluran puting susu ke dalam ambing adalah suatu cara sederhana menanggulangi hampir semua klinis mastitis dan dapat menghapus infeksi (Owens *et al.*, 1988). Efektivitas antibiotika sebagian tergantung pada kepekaan patogen terhadap antibiotika dan juga kepada khasiat antibiotika. Khasiat antibiotika dipengaruhi oleh penyerapan, distribusi, metabolisme dan pengeluaran antibiotika dari susu.

Tidak ada antibiotika yang ideal untuk semua kondisi mastitis (dengan kata lain: 'spektrum lebar') untuk digunakan pada sapi laktasi dan pada sapi kering. Hampir semua pengobatan antibiotika diberi tanpa pengetahuan tentang agen patogen penyebab mastitis (Sawant, 2005).

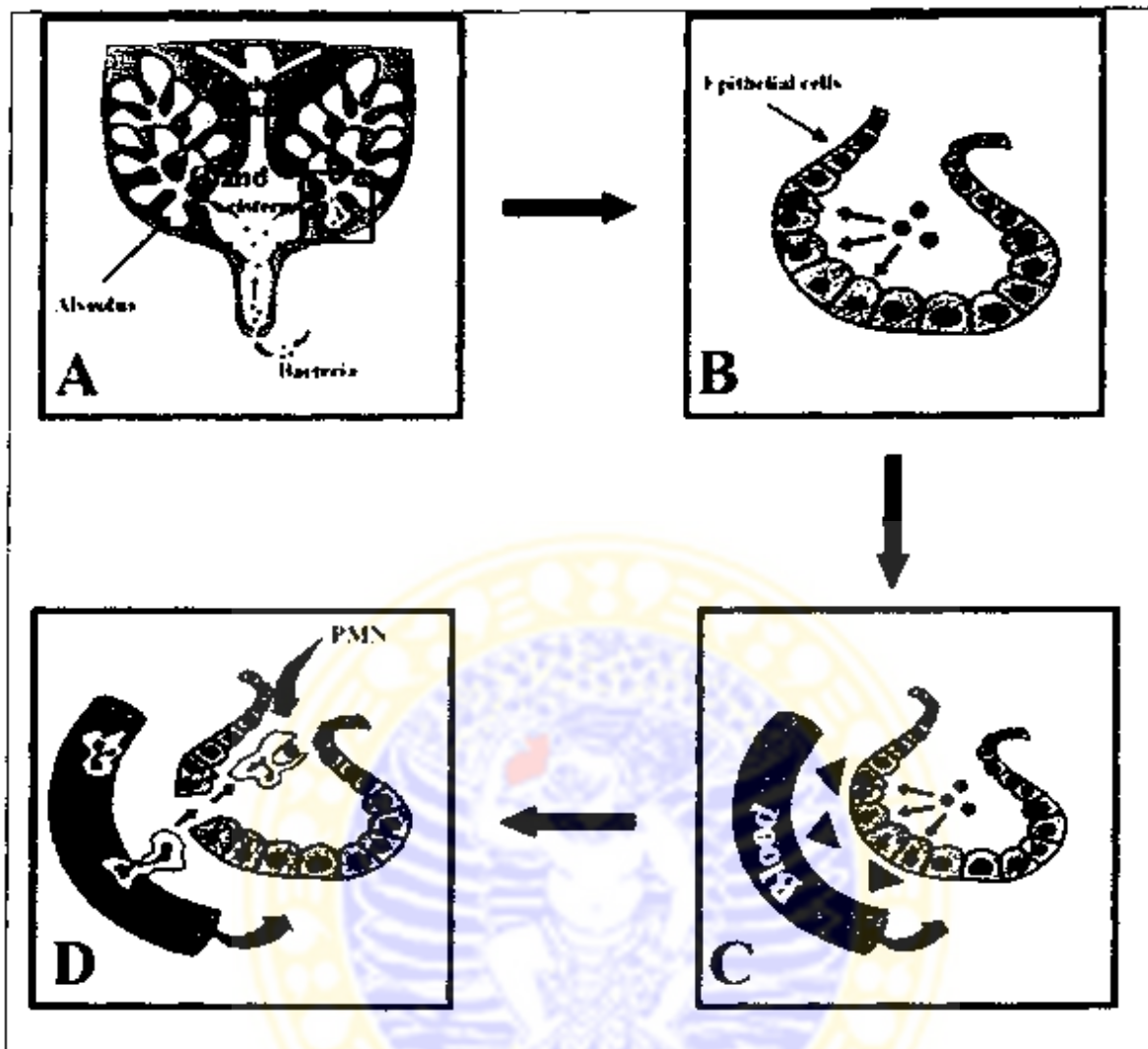
Pengobatan antibiotika pada umumnya diberikan melalui saluran puting susu tetapi ini harus dilaksanakan secara hati-hati dengan membersihkan mulut puting susu dengan suatu kain yang mengandung disinfektan. Pengobatan mastitis dapat dilakukan dengan 2 atau 3 suntikan dengan interval 24 jam, dan menolak susu dari sapi kurang 2 hari setelah pengobatan yang terakhir untuk

menghindari pencemaran antibiotika pada susu yang dihasilkannya (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 dapat dicemari oleh patogen, patogen dapat menembus saluran puting susu, infeksi dan peradangan terjadi pada saluran puting dan kelenjar susu (gambar 2.4)(Jones, 1998).

Semua ambing sapi perah yang secara terus menerus terpapar oleh patogen dapat mengalami mastitis. Puting susu sapi yang terpapar dengan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* dan *Streptococcus dysgalactiae* akan mudah terkena infeksi ketika puting susu yang sakit dan luka pada saluran puting susu dikolonisasi oleh patogen, atau pada sapi perah yang berbaring pada alas tidur yang dicemari patogen (Owens *et al.*, 2001). Adakalanya paparan akan meningkat oleh peralatan pemerahan susu yang kurang bersih atau melalui pencucian ambing dengan air yang tercemar bakteri. Hal ini dapat dihindari dengan metode sederhana yaitu membersihkan peralatan secara higienis.



Gambar 2.4 Proses terjadinya mastitis pada kelenjar susu sapi perah
 Keterangan: A. Bakteri melewati saluran puting dan memasuki glandula sistemna. B. Bakteri melekat pada sel epitel. C. Toksin yang diproduksi bakteri menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. D. PMN bergerak dari pembuluh darah menuju alveolus untuk menetralsir bakteri.
 (Zdanowicz, 2002)

2.1.5 Tinjauan Sistem Imun Hospes Terhadap Mastitis

Dalam rangka mengurangi resiko lebih lanjut *Staphylococcal mastitis* di perlukan pendekatan multidisiplin, termasuk pendekatan imunogenetik. Pengetahuan yang dikombinasikan antara imunologi, genetika, dan

epidemiologi populasi saat ini cenderung pada strategi pembuatan vaksin baru atau pemilihan azas keturunan untuk meningkatkan kemampuan reaksi imun dan meningkatkan kekebalan terhadap penyakit (Mallard and Barnum, 1993). Perkembangan pengetahuan sistem imun pada sapi perah saat ini digunakan untuk menghasilkan vaksin baru. Pengetahuan memfokuskan pada pemahaman imunologi yang relevan untuk mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus*, penanda genetik yang bersifat prediksi untuk penyakit ini, dan bagaimana cara terbaik untuk meningkatkan kesehatan ambing, merupakan hal yang perlu dilakukan (Zadock, 2002).

2.1.5.1 Sifat alami Sistem Kekebalan Hospes

Pertahanan dari kelenjar susu dalam melawan patogen penyebab mastitis dilakukan dengan berbagai cara antara lain secara fisik anatomis, seluler dan faktor protektif yang terlarut (Sordillo *et al.*, 1995), dan perlindungan dari penyakit infeksi yang diatur oleh kedua komponen sistem imun yaitu *nonspecific* (bawaan) dan *specific* (perolehan). Mekanisme kekebalan *nonspecific* mengacu pada anatomis, fisiologis, dan penghalang pertahanan yang bertindak sebagai suatu garis pertahanan pertama (Craven and Anderson, 1984). Di dalam kelenjar susu sapi perah saluran puting susu bertindak sebagai pertahanan mekanik dan penghalang kimia, dengan otot *sphincter* berfungsi untuk menutup mulut puting susu dan keratin sebagai suatu agen antimikrobia (Craven and Anderson, 1984). Antibakterial penting lainnya dari unsur *nonspecific* yang berasal dari kelenjar susu meliputi *lactoperoxidase*,

thiocyanate, sistem hidrogen peroksida, *lactoferrin*, *lysozyme* dan komplemen (Sordillo *et al.*, 1995). *Lysozyme* dan komplemen sering bertindak secara sinergis pada lisis dinding sel bakteri (Trinidad *et al.*, 1990). Sebagai tambahan untuk memudahkan sel bakteri lisis dan hilangnya antigen, pengaktifan sistem komplemen memperkuat respon peradangan dengan meningkatkan permeabilitas vaskuler dan menarik sel fagosit seperti neutrofil dan makrofag melakukan *chemotaxis*. Komplemen juga berfungsi membantu peningkatan fagositosis mantel bakteri dan patogen lainnya dengan suatu opsonin utama yang disebut C3b, yang mempunyai reseptor pada neutrofil dan makrofag. Pentingnya komplemen di dalam kelenjar susu pernah menjadi kontroversi, bagaimanapun pada kolostrum, sel somatik pada susu sehat dan susu mastitis, aktivitasnya bakterisidal bersifat *heat-labile*, hal ini menunjukkan bahwa komplemen mungkin dilibatkan (Guidry *et al.*, 1994).

Mekanisme imun spesifik dimediasi oleh limfosit T dan B yang memilih, mengenali dan mengeliminasi antigen asing. Berbeda dengan mekanisme kekebalan bawaan, imunitas perolehan memperlihatkan keaneka ragam luar biasa, spesifisitas yang tinggi, mempunyai suatu kemampuan dapat membedakan sel hospes dan sel asing, dan memori terhadap patogen yang pernah dikenali. Walaupun mekanisme kekebalan non spesifik atau spesifik mendominasi berbagai tahap infeksi, dua aspek sistem imun ini adalah saling tergantung dan pada umumnya bertindak bersama-sama untuk mengatasi infeksi. Sebagai contoh sel fagosit seperti makrofag terlibat dalam pengaktifan imunitas seluler spesifik dan humoral (Sears and Belschner, 1996). Dalam

proses fagositosis, makrofag memproses antigen asing dan mengeluarkan *peptide* pada permukaan sel mereka bersama dengan molekul *major histocompatibility* (MHC). MHC-PEPTIDE yang kompleks ketika secara rinci dikenali oleh *T-Cells* menyebabkan pengaktifan seluler, proliferasi, dan pelepasan *soluble mediators* (*interleukins*) yang meningkatkan respon peradangan (Pankey, 1980). Pada gilirannya mekanisme respon imun spesifik akan mengatur intensitas respon peradangan.

Respon peradangan di dalam ambing diaktifkan oleh kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik atau oleh invasi patogen. Gejala peradangan kelenjar susu yang utama meliputi peningkatan aliran darah, meningkatnya permeabilitas kapiler, dan peningkatan antibodi dan sel fagosit. Kenaikan suplai darah di sekitar jaringan disebabkan oleh konstiksi pembuluh darah yang membawa darah menjauh dari area yang terkena infeksi (Hockett *et al.*, 2000). Kapiler yang mengembang yang berisi cairan dan sel dapat menyebabkan temperatur meningkat, merah, dan edema seperti yang terjadi pada mastitis. Peningkatan permeabilitas kapiler mendorong migrasi leukosit ke dalam jaringan ambing. Mediator kimia berasal dari sel darah putih (leukosit) dan mikroorganisme invasi dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan mengurangi produksi susu kecuali jika infeksi dan peradangan dapat dengan cepat disembuhkan.

Kemampuan hospes untuk mengeliminasi suatu infeksi dan peradangan oleh bakteri, sebelum terjadi kerusakan jaringan yang parah tergantung sebagian besar pada perekrutan yang efisien neutrofil, makrofag, dan limfosit ke

lokasi radang. Ketiga jenis sel tersebut adalah sel anggota *somatic cell count* (SCC) yang merupakan komponen normal dari sekresi kelenjar susu pada semua tahap laktasi. Invasi bakteri diikuti oleh masuknya banyak sel, terutama neutrofil ke dalam kelenjar susu. Fungsi neutrofil adalah untuk mencerna (*phagocytose*) dan kemudian membunuh mikroorganisme invasi tersebut (Mallard and Bamum, 1993). Antimikroba *peptida* dapat diisolasi dari neutrofil yang disebut *defensins* yang cocok untuk Gram positif dan Gram negatif yang ditemukan dari kasus mastitis. Kemampuan fagositik dan membunuh bakteri termasuk *Staphylococcus aureus*, secara genetik diregulasi dan dipengaruhi oleh gen MHC. Faktor tersebut yang dikombinasi dengan adanya kasein susu dan lemak susu dapat membantu aktivitas fagositosis.

Makrofag adalah sel fagosit yang utama dalam susu normal dan sebagai konsekuensinya adalah sel yang pertama yang menghadapi bakteri (Mallard and Bamum, 1993). Makrofag dalam kelenjar susu sering dianggap kurang penting dibanding neutrofil sebab makrofag pada umumnya berisi sejumlah lemak yang cenderung untuk merusak kemampuan fagositosis (Matthews *et al.*, 1994). Makrofag melepaskan faktor penting, seperti *interleukin-8* (IL-8), yang merupakan *chemotactic* untuk neutrofil. Makrofag juga berfungsi menambah imunitas dengan mengolah antigen virus dan bakteri ke limfosit T bersama-sama dengan gen MHC Class I atau II. Peran makrofag adalah menambah fungsi limfosit spesifik dalam mediasi imunitas (seluler dan humoral).

Limfosit meliputi kira-kira 10% dari leukosit kelenjar susu, dimana *T-Cells* sekitar 50% dan *B-Cells* 20%. *B-Cells* mengeluarkan antibodi (imunoglobulin)

dan berbagai interleukin yang merupakan mediator humoral imunitas spesifik. *T-Cells*, pada sisi lain menengahi imunitas seluler dengan bertindak sebagai sel *cytotoxic* agresif atau untuk membantu ke arah lain sel leukosit. Ada tiga jenis sel *T-Helper* telah dikenali pada tikus dan manusia (TH-1, TH-2, To) (Sordillo *et al.*, 1995). Masing-masing subset *T-Helper* ini melepaskan *cytokines* berbeda. *T-Helper 1* cenderung untuk menghasilkan *gamma-interferon* dan IL-2 yang meningkatkan imunitas seluler; sedangkan sel *T-Helper 2* cenderung untuk menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10 yang meningkatkan respon antibodi (Sordillo *et al.*, 1995). Bukti terbaru menyatakan bahwa ada suatuimbangan dinamis antara respon *antibody-mediated* dan *cell-mediated* dan mempengaruhi klinis penyakit, dan keseimbangannya diatur oleh subsets limfosit T (Mallard and Bamum, 1993). Walaupun subset T-Cell ini belum teridentifikasi dalam kelenjar susu, jenis *cytokine* yang dilepaskan oleh sel *T-Helper* tidak diragukan dalam mempengaruhi peradangan. Secara umum, relatif sedikit diketahui peran *T-Cells* pada respon imun terhadap antigen *Staphylococcus aureus*, tetapi *T-Cells* dari kelenjar susu pada sapi perah cenderung lebih sedikit merespon antigen bakteri dan mitogens dibanding limfosit dari darah (Craven and Anderson, 1984). Memori imunitas *T-Cells* mempunyai peran penting karena dalam hitungan detik dapat mengenal antigen asing dan melakukan langkah-langkah berikutnya ke antigen asing tersebut.

Limfosit T dapat juga menjadi non-spesifik yang dirangsang oleh antigen khusus, melalui mekanisme baru *crosslink* antar variabel dari reseptor untuk antigen (reseptor antigen T-Cell, TcR) dengan molekul MHC *Clas II* pada

antigen presenting cells (Mallard and Barnum, 1993). Antigen ini disebut *superantigens* sebab merupakan stimulator yang sangat kuat terhadap semua sub tipe *T-Cell* di berbagai jenis hewan. *Superantigens* berbeda dari yang mitogen. Banyak molekul yang berbeda dapat bertindak sebagai *superantigens*, tetapi prototipe *superantigen* adalah *staphylococcal enterotoxin* (SE) B yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes* (Shihabara and Nakamura, 1999). Beberapa SE yang berbeda yang berhasil diidentifikasi sebagai *superantigens* telah ditemukan seperti (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, dan TSST-1) (Sordillo *et al.*, 1995). Walaupun *superantigens* dipertimbangkan sebagai faktor penting dalam patogenesis penyakit, sebagian besar dipelajari tentang efeknya yang tepat pada sistem imun. Pertalian antara molekul MHC pada limfosit B dan reseptor sel *T-cytotoxic* oleh *Staphylococcus aureus exotoxins* dapat mendorong kearah penghancuran *B-Cells*. Tetapi jika sel *T-Helper* diaktifkan oleh toksin dapat mendorong kearah pengaktifan *B-cells* dengan pengeluaran secara besar antibodi non spesifik (Sordillo *et al.*, 1995). Pengaktifan non spesifik *B-Cells* dan *T-Cells* merupakan suatu strategi yang bermanfaat bagi mikro organisma penyebab infeksi untuk melemahkan imunitas spesifik hospes. *Superantigens* telah pula dikenal menyebabkan makrofag manusia untuk melepaskan IL-1 dan *tumor necrosis factor-alpha* (Shihabara and Nakamura, 1999). Faktor ini berkontribusi terhadap terjadinya *shock-like symptom* dan *immunosuppresion* yang terkait dengan *superantigens*. Selama infeksi pada kelenjar susu sejumlah exotoxins penting diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* antara lain *alpha*, *beta*, *delta*, *gamma-foxins* dan

leucocidin. Beberapa sifat dari toksin tersebut mirip dengan *SE toxins*, tetapi kemampuannya bertindak sebagai superantigen belum terbukti.

Immunoglobulin yang dikeluarkan dari limfosit B dewasa (sel plasma) adalah merupakan faktor penting untuk mengendalikan mastitis karena antibodi spesifik diarahkan melawan bakteri penyebab mastitis (Mallard and Barnum, 1993). Isotipe immunoglobulin yang ditemukan pada susu dan kolostrum meliputi IgG1, IgG2, IgM, dan IgA. Immunoglobulin yang diproduksi di dalam kelenjar susu adalah IgM dan IgA, sedangkan yang dari darah ke dalam sekresi susu adalah IgG1 dan IgG2.

Fungsi utama immunoglobulin adalah opsonisasi bakteri untuk meningkatkan fagositosis, tetapi antibodi juga berfungsi untuk mengurangi multiplikasi bakteri, menetralkan toksin yang dihasilkan, dan menghalangi adhesi bakteri ke epitelium kelenjar susu (Sears and Belschner, 1998). Konsentrasi immunoglobulin meningkat sejalan dengan involusi kelenjar susu dan konsentrasi puncak tercapai pada kelenjar susu yang involusi total dan di dalam kolostrum.

2.1.5.2 Keradangan pada Kelenjar Susu Sapi Perah

Pertahanan alami dari kelenjar susu sapi perah secara terus menerus dihadapkan pada paparan bakteri dari kondisi sekitarnya. Patogen jika berhasil penetrasi ke dalam kelenjar susu maka sistem imun bawaan dan perolehan akan berusaha mencegah infeksi sebelum kerusakan yang serius terjadi pada kelenjar susu. Selanjutnya diawali dengan karakterisasi reaksi peradangan akut

yang didominasi rekrutmen neutrofil kedalam sel sekresi kelenjar susu. Keadaan tersebut menyebabkan peningkatan SCC (Green, 2003).

Tanda awal peradangan memicu peradangan akut dalam kelenjar susu sangat bervariasi. Beberapa mediator kimiawi dilepaskan dalam beberapa jam setelah infeksi dan termasuk fraksi komplemen, prostaglandin, *platelet activating factor*, dan sitokin fase akut seperti IL 1, TNF- α dan IL-8 (Riollet *et al.*, 2000). Senyawa kimiawi tersebut dikeluarkan oleh leukosit dalam susu atau epitel sel kelenjar susu dalam merespon adanya produk bakteri dan merupakan sistem pertahanan hospes dalam melawan patogen (Green, 2003).

Langkah awal dalam melibatkan leukosit adalah kontak awal dan hilangnya interaksi antara leukosit dalam aliran darah dan sel endotelial dari kapiler vena. Pengaturan leukosit terhadap penembusan dinding pembuluh darah dimediasi oleh anggota *selectin family* (Green, 2003). Molekul yang termasuk *selectin family* adalah *heavily glycosylated* dan rantai tunggal yang terintegrasi dalam membran protein yaitu CD62P dan CD62E keduanya ada dalam sel endotel dan CD62L yang ada dalam leukosit. Selama respon peradangan, terjadi peningkatan ekspresi *cytokines* oleh CD62P dan CD62E pada endotel yang berinteraksi dengan *ligand* pada leukosit yang memfasilitasi migrasinya leukosit. Neutrofil diaktivasi oleh *cytokines* atau *chemoattractants* yang dilepaskan CD62L (Kishimoto *et al.*, 1989).

Invasi bakterial pada kelenjar susu menyebabkan dikeluarkannya mediator peradangan dalam usaha untuk mengendalikan dan mengeliminasi penyebab infeksi. Mediator peradangan termasuk di dalamnya adalah

prostaglandins, histamine, fraksi komplemen dan *acute fase cytokines* seperti IL-1, TNF- α , IL-6 dan IL-8 (Riollet *et al.*, 2000). Produk bioaktif tersebut mempunyai efek pada jaringan lokal dan juga mengarahkan leukosi migrasi ke jaringan yang mengalami peradangan (Riollet *et al.*, 2000), dan berefek sistemik seperti demam, hilangnya hambatan antara darah dan susu dan terjadinya peningkatan pelepasan leukosit dari sumsum tulang (Green, 2003).

Tumor necrosis factor- α adalah mediator utama dalam merespon bakteri Gram negatif (Riollet *et al.*, 2000) dan juga berperan dalam respon imun bawaan ke agen infeksius lainnya. *Tumor necrosis factor- α* dapat dirangsang sintesisnya dalam berbagai tipe sel seperti fibroblas, sel epitel, *mast cells*, neutrofil dan diproduksi secara masal oleh monosit – makrofag. Faktor eksogenous dan endogenous yang diproduksi oleh bakteri, virus dan tumor dapat merangsang sel untuk memproduksi TNF- α (Wang and Tracey, 1999). *Lipopolysaccharide* (LPS) adalah induksi yang klasik dalam sintesis TNF- α dalam monosit dan makrofag melalui CD14 yang merupakan sebuah reseptor spesifik LPS (Wright *et al.*, 1990). Paape *et al* (2002) melaporkan adanya CD14 pada PMN dan makrofag dari kelenjar susu.

Aktivitas dari TNF- α dimediasi dengan melalui paling tidak dua tipe sel permukaan reseptor yaitu tipe I (TNFR I) dan tipe II (TNFR II) yang ada pada seluruh tipe sel (Hohman *et al.*, 1989). Kebanyakan aktivitas biologis dari TNF- α adalah dimediasi oleh TNFR I (Espevik *et al.*, 1990) dan terkait dengan peningkatan transkripsi gen target tertentu.

Jika TNF- α diproduksi dalam jumlah yang sedikit, maka TNF- α berperan secara lokal pada aktivasi sel endotelial dalam sistem pembuluh darah yang memfasilitasi migrasi neutrofil, monosit dan limfosit. TNF- α menstimulasi makrofag dan tipe sel lainnya untuk mensekresi *chemokines* yang berperan dalam rekrutmen leukosit dan mengaktifkan leukosit untuk membunuh agen infeksius (Baggioni *et al.*, 1997).

Jika TNF- α diproduksi dalam jumlah yang banyak, TNF- α dapat masuk ke sistem sirkulasi dan mempunyai efek sistemik yang termasuk di dalamnya adalah induksi demam dengan peningkatan sintesis prostaglandin dalam hypothalamus, merangsang makrofag dan sel endotel vaskuler untuk meningkatkan sekresi IL-1 dan IL-6 dalam *acute fase proteins* (Bauman and Gauldie, 1994). Peningkatan konsentrasi TNF- α dalam kelenjar susu yang terinfeksi juga berkorelasi dengan peningkatan migrasi leukosit dari aliran darah ke kelenjar susu (Paape *et al.*, 2002). TNF- α jelasnya terkait dengan peradangan akut, tetapi tidak terdeteksi dalam susu sapi perah dengan kasus mastitis kronik yang disebabkan *Staphylococcus aureus* (Roillet *et al.*, 2000).

Interleukin-1 adalah *prototipe cytokine* yang multi fungsi berperan hampir di setiap tipe sel dan sering bersinergis dengan TNF- α (Dinarello, 1999). Sumber utama dari IL-1 adalah makrofag yang diaktivasi, tetapi beberapa tipe sel seperti sel epitel dan sel endotel dapat memproduksi IL-1. Khusus untuk kelenjar susu, sel epitel kelenjar susu dapat memproduksi IL-1 dengan rangsangan LPS (Boudjellab *et al.*, 2000). Ada dua bentuk dari IL-1 yaitu IL-1 α dan IL-1 β , tetapi aktivitas biologisnya sama dan kebanyakan aktivitas IL-1 yang

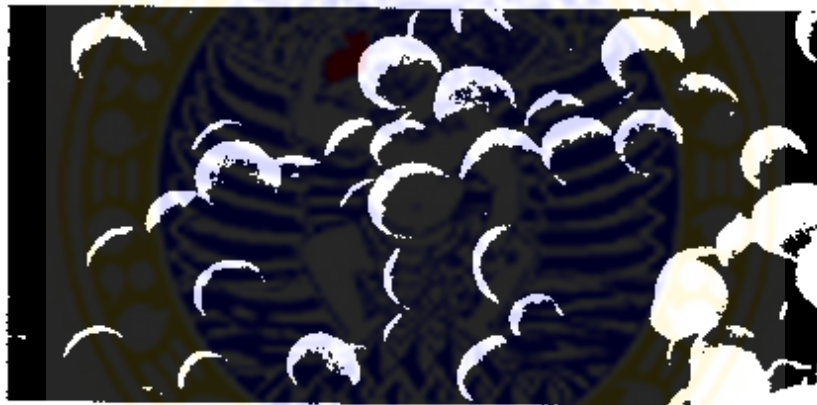
ditemukan dalam sirkulasi darah adalah IL-1 β (Baggioni *et al.*, 1997). Dua membran reseptor yang berbeda telah diidentifikasi terkait dengan IL-1 yang keduanya termasuk dalam *lg superfamily* yang merujuk reseptor tipe I dan tipe II (Sims *et al.*, 1993).

Jika diproduksi dalam jumlah sedikit, IL-1 beraksi secara lokal pada sel endotelial untuk mempromosi koagulasi dan meningkatkan ekspresi molekul permukaan yang memediasi adesi leukosit. IL-1 tidak secara langsung mengaktifkan leukosit, tetapi menyebabkan makrofag dan sel endotelial mensintesis chemokines yang mengaktifkan leukosit. Jika IL-1 disekresi ke sirkulasi, IL-1 bergabung bersama TNF- α menyebabkan demam, mensintesis *acute fase proteins* dan mengawasi pembuangan hasil metabolik (Baggioni *et al.*, 1997).

Interleukin-8 (IL-8) termasuk famili *chemokine* dari *cytokines*. IL-8 dianggap sebagai faktor *chemotactic* utama yang berpengaruh secara langsung dalam rekrutmen neutrofil dan aktivasinya terfokus pada daerah radang (Harda *et al.*, 1994). Monosit dan makrofag tampaknya merupakan sumber seluler yang dominan dalam menghasilkan IL-8 tetapi beberapa sel seperti sel epitelial dapat juga memproduksi *chemokine* (Eckmann *et al.*, 1993). Boukjelab *et al* (2000) melaporkan produksi IL-8 oleh sel epitel kelenjar susu dengan stimulasi LPS. Barber dan Yang (1998) mengindikasikan adanya aktivitas IL-8 dalam sekresi susu dari sapi penderita mastitis klinis oleh *Staphylococcus aureus*.

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif dan termasuk anggota famili Micrococcaceae yang patogen (Todar, 2002), berbentuk menyerupai buah anggur (gambar 2.5). 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.



Gambar 2.5. Gambaran mikroskop elektron *Staphylococcus aureus* (Todar, 2002)

Staphylococcus aureus membentuk koloni kuning agak besar pada media kaya, sedangkan *Staphylococcus epidermidis* membentuk koloni putih agak kecil. Sifat *Staphylococcus aureus* sering hemolitik pada agar darah kelinci dan *Staphylococcus epidermidis* bersifat non hemolitik (table 2.1). Bakteri Staphylococci bersifat katalase positif dan oksidase negatif. *Staphylococcus*

aureus dapat tumbuh pada suhu 15 sampai 45 ° C dan pada konsentrasi Na Cl sekitar 15 %. Hampir semua strain *Staphylococcus aureus* menghasilkan koagulase, sedangkan *Staphylococcus epidermidis* tidak menghasilkan koagulase (Todar, 2002).



Gambar 2.6 Proses pembelahan *Staphylococcus aureus*

Keterangan : *Staphylococcus aureus* yang mengalami pembelahan yang sempurna. (W₂) bentukan dinding sel baru yang dapat dibedakan dengan dinding sel lama W₁. (Chr) kromosom yang tampak . (M) cytoplasmic membranous bodies (Navarre and Schneewind, 1999)

Staphylococci berbentuk bulat dengan diameter sekitar 1 mikrometer. Bakteri tumbuh dalam gerombolan yang disebabkan staphylococci membelah diri dalam dua tempat pembelahan (gambar 2.6). Bentuk kokus dapat dibedakan antara *Staphylococci* dengan *Streptococci* yang mempunyai bentuk

mirip dengan rantai. Hal ini disebabkan *Streptococci* hanya mempunyai satu tempat pembelahan. Uji katalase juga merupakan hal penting untuk membedakan dari kelompok *Streptococci*, dimana *Streptococci* adalah katalase negatif. Uji ini dilakukan dengan penambahan hydrogen peroksida 3% ke koloni dalam media agar.. Katalase positif ditandai dengan keluarnya gelembung gas O₂ (Todar, 2002). Uji katalase jangan dilakukan dalam media agar darah sebab darah mengandung enzim katalase.

Tabel 2.1 Differensiasi Genus *Staphylococcus* yang bersifat zoonosis

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

Mylotte (2003)

Staphylococcus aureus sering menyebabkan mastitis pada sapi perah (Akineden *et al*, 2001). Bakteri ini juga merupakan penyebab gangguan kulit dan jaringan lunak (Lowy, 1998), beberapa infeksi termasuk di dalamnya *bacteriemia*; *endocarditis*; *sepsis*, dan *toxic-shock syndrome* (TSS) pada manusia. *Staphylococcus aureus* juga penyebab *food poisoning* yang menyebabkan muntah dan atau diarrhea melalui pengeluaran *enterotoxin* ke makanan (Todar, 2002).

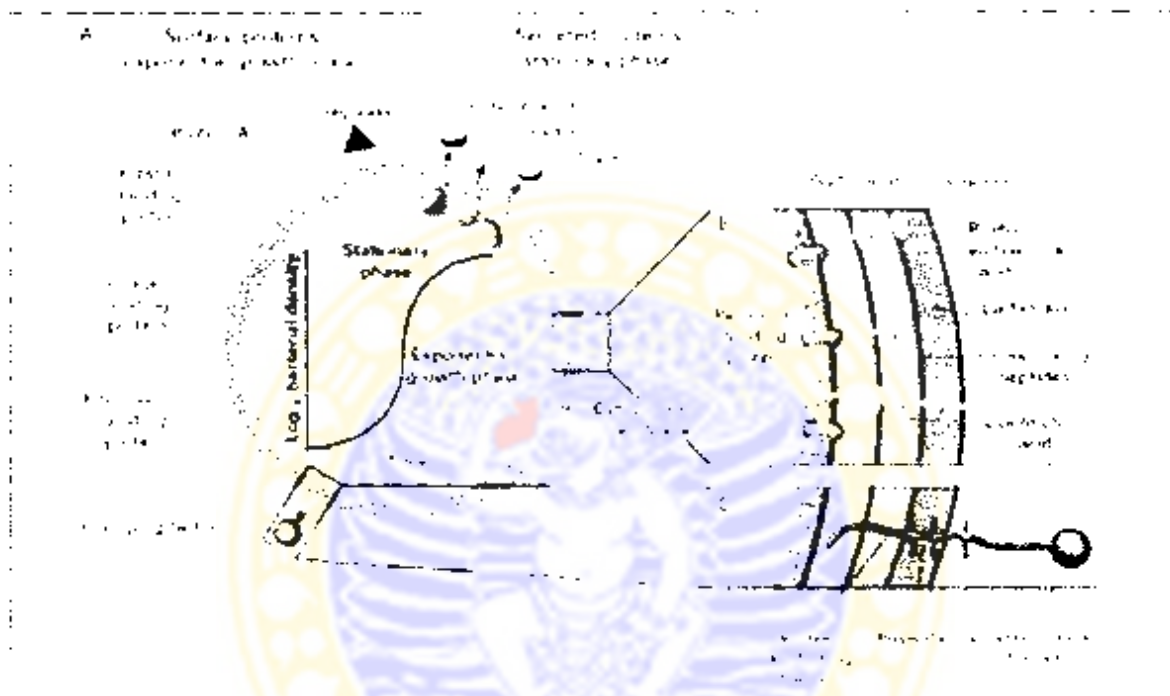
2.2.1 Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus*

Menurut Landolo (1989) faktor virulensi *Staphylococcus 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 hospes atau matrik ekstra seluler dianggap merupakan faktor penting, sementara faktor yang terkait dengan invasi dan penyebaran ke mekanisme pertahanan hospes belum berperan. Lebih dari 40 ekstra seluler dan *cell-surface associated proteins* telah diidentifikasi yang terkait dengan faktor virulensi (lampiran 1 dan 2).

Berdasarkan pada aktivitas biologisnya, faktor virulensi dapat dibagi menjadi tiga fungsi yaitu a). berperan sebagai mediator adhesi bakteri ke sel atau jaringan hospes, b). mempromosi invasi dan penyebaran bakteri, c). memproteksi bakteri dari sistem pertahanan hospes. Beberapa faktor virulensi mempunyai lebih dari satu fungsi seperti α -hemolysin dan Protein pengikat fibrinogen. α -hemolysin mempunyai kemampuan untuk mempromosi invasi bakteri dengan menghancurkan sel jaringan, mempromosi bakteri tahan terhadap monosit dan neutrofil serta mampu sebagai *immune escape factor* (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991). Protein pengikat fibrinogen dapat merangsang penempelan bakteri ke permukaan sel hospes dan juga berfungsi sebagai *immuno protection factor* melalui pembungkusan bakteri dengan fibrinogen yang larut air (Wann *et al.*, 2000).

Berdasarkan macamnya faktor virulensi meliputi faktor permukaan bakteri (protein, dinding sel *peptidoglycan*, kapsul polisakarida, protein A);

enzim hidrolisis (*nucleases, hyaluronidase, proteases* dan *collagenase*) yang fungsi utamanya adalah mengubah jaringan lokal menjadi nutrisi untuk kebutuhan bakteri; faktor biokimia yang dapat meningkatkan kemampuan intraseluler (*carotenoids, produksi katalase*); resistensi terhadap antibiotika (*β -lactamases* dan *penicillin binding proteins*). (gambar 2.7) (Lowy, 1998).



Gambar 2.7 Faktor virulensi yang dipunyai oleh *Staphylococcus aureus* (Lowy, 1998)

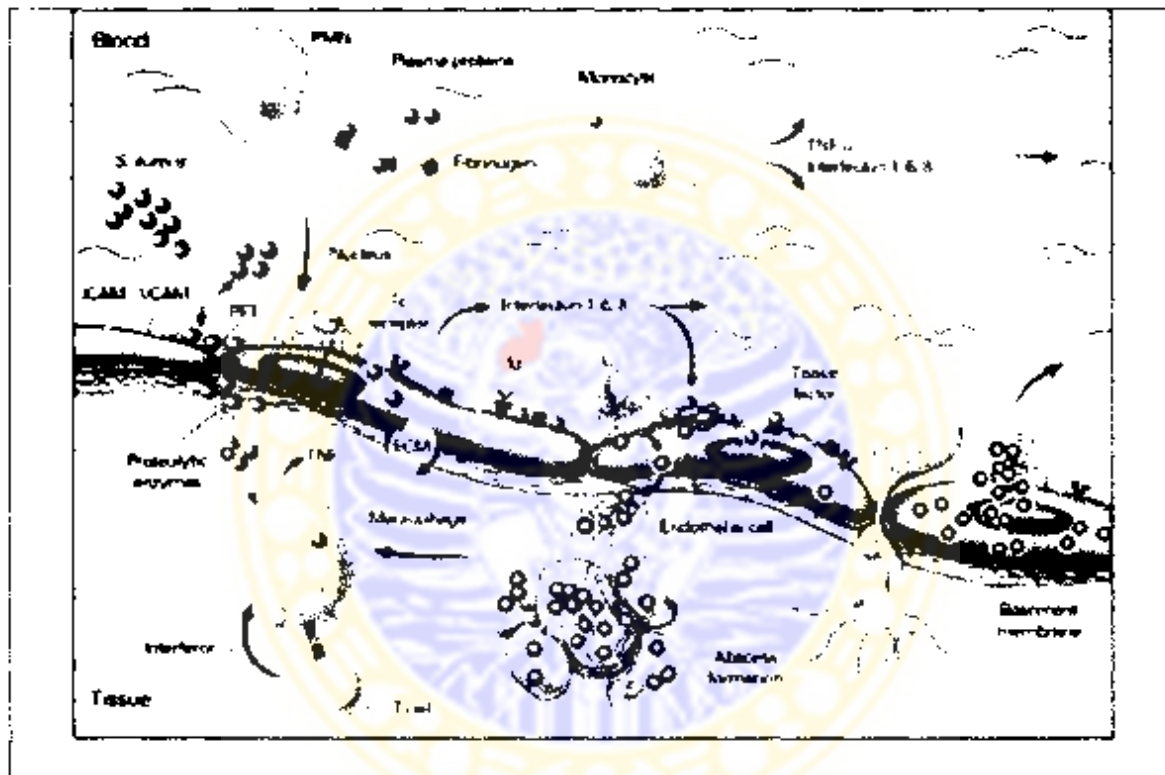
Toksin *Staphylococcus aureus* dapat dikelompokkan berdasarkan mekanisme aksinya termasuk *cytotoxins*, seperti α dan β -toxins, dan juga *pyrogenic toxins* seperti *exotoxins A & B* yang menyebabkan hemolisis diikuti dengan demam; *Toxic-shock syndrome toxin-1* (TSST-1) yang juga *exotoxins* dan lebih dekat kaitannya dengan enterotoxins (SEA, SEB, SEC_n, SED, SEE, SEG, SEH dan SEI), berfungsi sebagai *superantigen* yang menyebabkan

proliferasi sel-T dan pengeluaran *cytokine* dan berakibat adanya *toxic shock syndrome* dan keracunan makanan yang klasik. Toksin *exfoliative* merupakan toksin *epidermolytic* (ET) A dan B yang menyebabkan *staphylococcal scalded-skin syndrome* (Lowy, 1998; Dinges, 2000; Sutra & Poutrel, 1994).

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

Setelah terjadi kolonisasi, *Staphylococcus aureus* menginvasi jaringan yang dimediasi oleh beberapa bahan ekstra seluler dan *cell-associated proteins*, termasuk α - *toxins dan haemolysins* (β , χ , δ) yang menyebabkan *lysis* pada eritrosit dan leukosit bersama dengan *leukocidin* dan *leukotoxin* yang berakibat terjadinya abses dan *septic shock* (gambar 2.8). Patogenesis kondisi ini disebabkan oleh kemampuan toksin untuk menghancurkan sel eukaryotik. Pada epitel paru-paru, pembengkakan osmotik menyebabkan pecahnya

integritas sel dengan efek meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Efek pada hospes adalah odema paru-paru atau sindroma stress pematangan pada orang dewasa. Produksi *haemolytic pore-forming & pro-inflammatory toxins*, *pyrogenic-toxins* atau *exfoliative toxins* memudahkan *Staphylococcus aureus* untuk menyebar ke jaringan sekitarnya dan toksin ini cenderung diproduksi selama fase stasioner infeksi (Dinges, 2000; Lowy, 1998).



Gambar 2.8 Patogenesis infeksi oleh *Staphylococcus aureus* (Lowy, 1998)

Patologi anatomi dari penyakit *Staphylococcus aureus* adalah sangat bervariasi tergantung dari peran faktor virulensi. Pada *endocarditis* dengan tikus sebagai model, Protein pengikat *fibronectin* (Schenning *et al.* 1993), kapsul polisakarida (Lee *et al.*, 1997), *clumping factor* (Moreillon *et al.*, 1995) dan

collagen adhesin (Heinz *et al.*, 1996) merupakan faktor penting untuk patogenesis. Pada infeksi luka dengan tikus sebagai model ditemukan bahwa protein pengikat fibrinogen sebagai faktor yang penting (Palma *et al.*, 1996). Pada model *murine septic arthritis* yang terbukti berperan penting adalah kolagen *adhesin* (Patti *et al.*, 1994) dan kapsul polisakarida (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 bakteri seperti transportasi, penyedia energi, metabolisme dan biosintesis asam amino. Penggunaan IVET berhasil mengidentifikasi tiga faktor virulensi yaitu gen penyandi *accessory gene regulator* (*agrA*), *glycerol ester hydrolase* (*geh*), dan tipe 8 kapsul polisakarida (*cap8*) (Lowe *et al.*, 1998).

Dapat disimpulkan bahwa patogenesis penyakit oleh *Staphylococcus aureus* adalah kompleks dan multifaktorial (Todar, 2002). Dalam penelitiannya 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* nya berdampak pada ekspresi faktor virulensinya yang mengakibatkan penurunan virulensi pada hewan coba.

2.2.2 Ekspresi dan Regulasi dari Faktor Virulensi

Potensi *Staphylococcus aureus* dalam menimbulkan infeksi dapat dikaitkan dengan koordinasi regulasi faktor virulensi. Pada awal infeksi *Staphylococcus aureus*, faktor virulensi diekspresikan untuk adhesi pada sel hospes dan terjadi kolonisasi. Faktor virulensi itu adalah kolagen, *fibronectin adhesin* dan protein A. Pada saat jumlah bakteri di jaringan yang terinfeksi sudah banyak, 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 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 tentang pengaruh lingkungan terhadap ekspresi dari α -haemolysin yang ekspresinya sangat tergantung 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 α -haemolysin dan protein pengikat *fibronectin* dan juga konsentrasi garam yang tinggi berakibat penurunan ekspresi α -haemolysin dan protein pengikat *fibronectin*. Hal ini menggambarkan

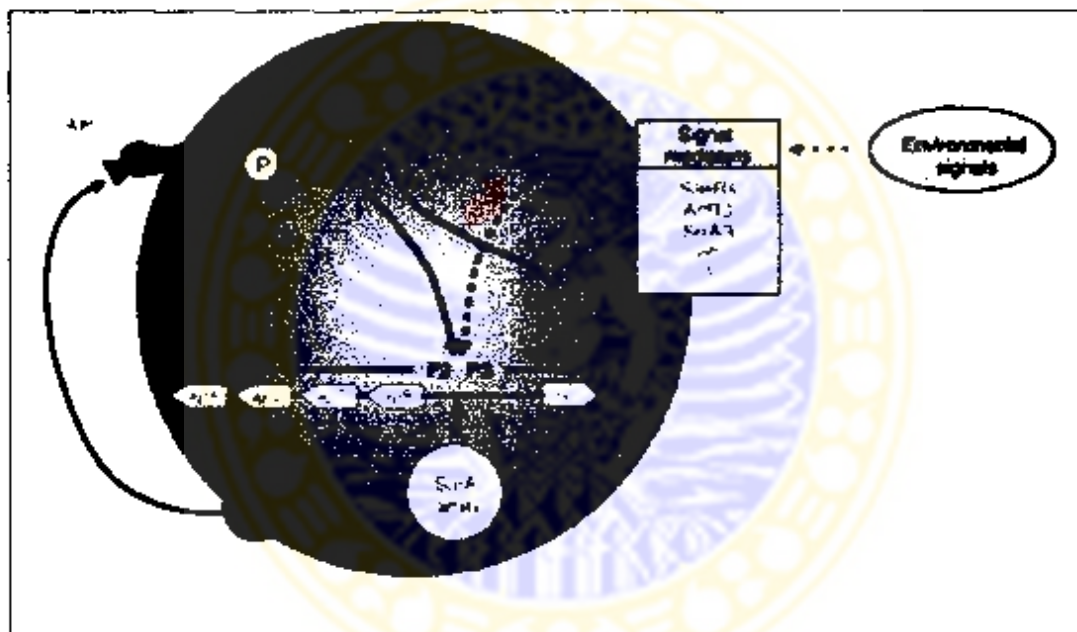
koloni *Staphylococcus aureus* tidak berbahaya pada kulit dan hidung yang disebabkan penghentian produksi α -haemolysin, enterotoxin C, ET-A dan Protein A (Chein and Cheung, 1998).

Staphylococcus aureus menjadi bakteri yang penting disebabkan oleh kemampuannya menghadapi sistim imun dari hospes maupun pengobatan antibiotika. Pada kasus pneumonia, kolonisasi dilakukan oleh bakteri dengan bantuan protein adhesin dan enzim ekstraseluler seperti hyaluronidases, proteases, collagenases yang memfasilitasi terjadinya invasi. Bakteri menghindari fagositosis dengan mengekspresikan 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 *signature tagged mutagenesis* (STM) terlihat beberapa gen bertindak sebagai regulator dari faktor virulensi. *Staphylococcal alternative sigma factor*, σB terkait dalam regulasi faktor-faktor virulensi baik secara langsung (*coa* dan *clf A*) (Nicholas et al., 1999) atau melalui regulasi *sarA* dan *sar H1*.

Agr locus semula diidentifikasi sebagai chromosom Tn 551 dengan ekspresi peningkatan sekresi toksin dan enzim seperti α -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) (gambar 2.9).



Gambar 2.9 Sistem *accessory gene regulator* pada *Staphylococcus aureus*.

Keterangan : Operon P2 mengkode melalui RNA II dengan mekanisme signal, sedangkan transkripsi operon P3 menggunakan RNA III sebagai molekul efektor dari lokus *agr*.

(Yarwood and Schlievert, 2003)

RNA III merangsang 16 gen penyandi toksin dan enzim dan menekan tujuh gen penyandi *surface associated protein*. 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 α -*hemolysin* (hla), β -*hemolysin* (hly), protein A (spa), *exfoliative toxin A* (eta A) dan *toxic shock syndrome toxin-1* (tst) (Chan and Foster, 1998). RNA III juga merupakan mRNA yang menyandi *delta-hemolysin* (hld)(Janzon *et al.*, 1989).

Locus regulasi yang kedua dengan efek pada produksi gen virulensi telah diidentifikasi oleh Cheung *et al* (1992) adalah *sar A*. Mutant fenotipe 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 *sar A* menyebabkan temahnya virulensi bakteri dalam beberapa hewan coba (Booth, *et al.*, 1997).

2.2.3 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), α -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 NaCl ke medium pertumbuhan bakteri juga dipelajari. Beberapa toksin termasuk enterotoksin B dan C (Regassa and Betty, 1993), *exfoliative toxin A* (*etaA*) (Bischoff *et al.*, 2001), α -hemolysin (Chein and Cheung, 1998), TSST-1 (Chan and Foster, 1998) ditekan oleh NaCl dan juga produksi protein A (Chan and Foster, 1998), sedangkan transkripsi *serine protease* dirangsang (Chein and Cheung, 1998).

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.

2.3 Penggunaan Antibiotika di Bidang Peternakan

Perkiraan yang tepat untuk mengestimasi penggunaan antibiotika di bidang peternakan adalah sulit, hal ini disebabkan tidak adanya koleksi nasional tentang penggunaan antibiotika tersebut. Sebagai perbandingan tentang penggunaan antibiotika di Amerika Serikat, hampir 90% penggunaan antibiotika di bidang peternakan digunakan sebagai konsentrasi *subtherapeutic* dengan

perbandingan 70% digunakan sebagai pencegahan penyakit dan sisanya sebagai faktor pendorong pertumbuhan (Levy, 2002).

Ada tiga kategori tentang penggunaan antibiotika dalam bidang kedokteran hewan yaitu sebagai pengobatan untuk mengatasi adanya penyakit, digunakan sebagai pencegahan (*prophylactic*) dalam resiko penyakit yang tinggi dan sebagai pendorong peningkatan produksi hewan ternak yang dikenal sebagai *subtherapeutic* (McAllister *et al.*, 2001). Meskipun lama waktu penggunaan berbeda antara tujuan sebagai *prophylactic* dan *subtherapeutic*, jumlah antibiotika yang dipakai umumnya sama yaitu 200 gram/ ton pakan (Levy, 2002).

Keuntungan dari penggunaan antibiotika untuk promosi pertumbuhan hewan digambarkan oleh Sawant (2005) sebagai berikut : 1) memperbaiki pertumbuhan, 2) mengurangi resiko penyakit, 3) memperbaiki sistem digesti, 4) untuk penggemukan hewan, dan 5) pengurangan waktu dan jumlah pakan dalam mencapai berat badan ideal untuk dipotong.

Beberapa golongan antibiotika disetujui penggunaannya dalam pakan ternak termasuk di dalamnya golongan betalaktam (penisilin, ampisilin, *cephalosporin*), golongan tetrasiklin, golongan aminoglikosida, golongan makrolida (eritromisin) dan sulfonamida. Kebanyakan golongan betalaktam digunakan dalam pengobatan mastitis yang termasuk di dalamnya adalah penisilin G, amoksisilin, *cloxacillin* dan *hetacillin* yang penggunaannya sebagai preparat *intra mammary* (Sawant, 2005).

Antibiotika lainnya yang sering digunakan dalam pengobatan mastitis adalah eritromisin yang bisa digunakan dalam masa laktasi atau masa kering, sementara tetrasiklin merupakan antibiotika penting yang digunakan dalam peternakan sapi perah sebagai tambahan minuman pengganti susu untuk anak sapi (Heinrichs *et al.*, 1995) yang berfungsi untuk meningkatkan pertambahan berat badan anak sapi. Lebih dari 60% peternakan sapi perah di Amerika Serikat menggunakan antibiotika dalam minuman pengganti susu, dan chlortetrasiklin dan oksitetrasiklin adalah paling banyak digunakan sebagai bagian antibiotika tambahannya.

2.3.1 Antibiotika Untuk Bakteri Gram positif.

Antibiotika betalaktam seperti penisilin, ampisilin dan *cephalosporines* sangat efektif terhadap *staphylococci* dan selalu dipakai sebagai obat pilihan untuk melawan infeksi (tabel 2.2). Bakteri Gram positif memproduksi dinding sel luar tebal yang terdiri dari *peptidoglycan* yang berguna untuk memproteksi bakteri dari sistem pertahanan hospes yaitu sistem komplemen ataupun kerusakan yang disebabkan tekanan osmotik. Karakteristik dari struktur cincin antibiotika betalaktam adalah mengikat *Penicillin binding Proteins (PBPs)* yang terkait dalam sintesis *peptidoglycan* dan menyebabkan pencegahan sintesis dinding sel. Resistensi terhadap betalaktam mungkin merupakan hasil dari degradasi enzimatik dari cincin betalaktam oleh betalaktamase atau rendahnya afinitas PBP.

Tabel 2.2 Beberapa antibiotika yang efektif terhadap bakteri Gram positif
(Medical Letter on Drugs and Therapeutics, 2000)

Agan Penyebab	Pilihan Obat Utama	Obat Alternatif
Enterococcus Endocarditis	Benzylpenicillin, amoxicillin+gentamicin, Streptomycin	Vancomycin+gentamicin, Sreptomycin, Linezolid, Quinolone
Staphylococcus aureus Tidak memproduksi enzim penisilinase	Benzylpenicilin, phenoxymethylpenicillin	Cephalosporin, Vancomycin, Ertromisin
Memproduksi enzim penisilinase	Flucioxacillin	Cephalosporin, Vancomycin, Ertromisin
Resisten terhadap methisilin	Vancomycin ± gentamicin ± rifampicin	Co-trimoxazole, Tetrasiklin, Quinolone, Rifampicin
Streptococcus pyogenes Grup A, C dan G	Benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, amoxicillin	Ertromisin, Cephalosporin, Vancomycin, Clindamicin
Streptococcus Grup B	Benzylpenicillin, amoxicillin	Ertromisin, Cephalosporin, Vancomycin
Streptococcus pneumoniae	Benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, amoxicillin	Ertromisin, Cephalosporin, Vancomycin, Rifampicin, Quinolone

Tetrasiklin adalah sangat lebar daya kerja yang meliputi hampir semua bakteri Gram positif dan Gram negatif yang patogen. Mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis protein bakteri (Tjay dan Rahardja, 1986), eritromisin berkasiat bakteriostatik terutama terhadap Gram positif dengan mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis protein bakteri (Tjay dan Rahardja, 1986), dan *ciproxin* termasuk golongan *fluoroquinolone* dengan daya

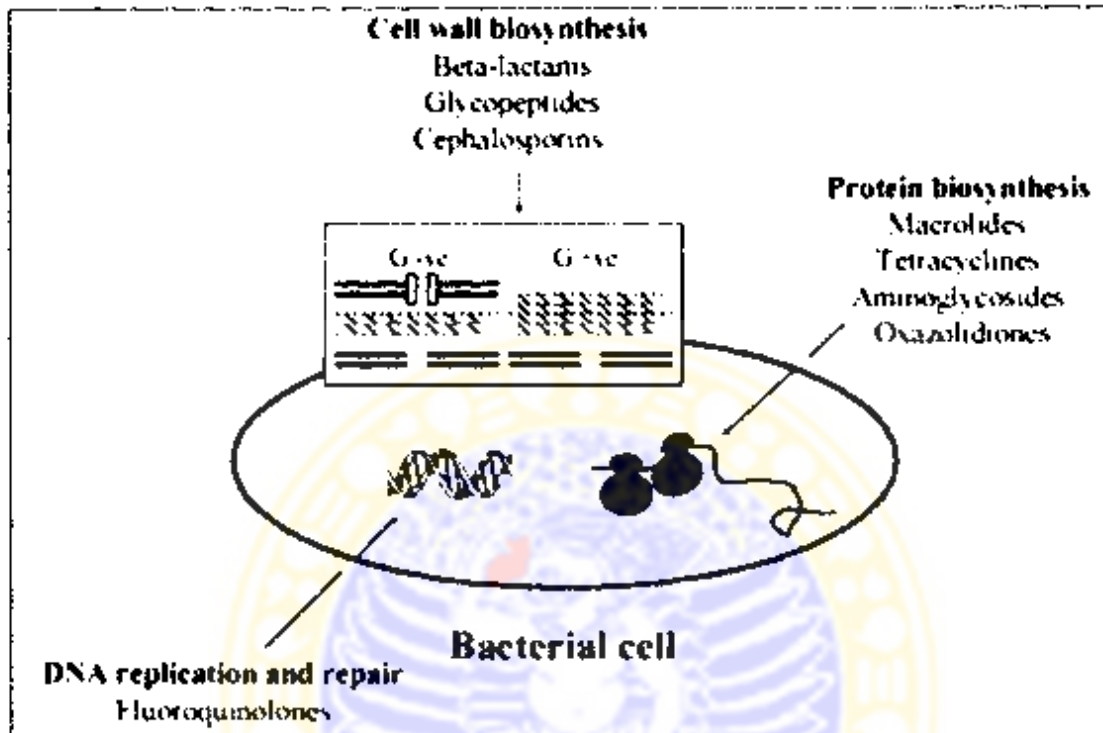
kerja meliputi hampir semua bakteri Gram positif dan Gram negatif yang patogen dan mekanisme kerjanya melalui penghambatan dari *DNA gyrase* bakteri (Gesin, 2004).

Pada dasarnya mekanisme kerja antibiotika dibagi menjadi tiga (gambar 2.10)(Sawant, 2005): 1) Penghambatan biosintesis dinding sel. Dinding sel bakteri mengandung *peptidoglycan*, merupakan rantai peptida dan *glycan* yang secara kovalent *crosslinked*. Hubungan tersebut memerlukan enzim *transpeptidase* untuk merapatkannya (Walsh, 2000). Antibiotika betalaktam (penisilin, ampisilin dan *cephalosporin*) mengikat enzim *transpeptidase* dan menghambat sintesis dinding sel. Enzim *transpeptidase* disebut juga *penicillin-binding proteins* (Walsh, 2000).

2) Penghambatan sintesis protein. Beberapa kelas antibiotika mampu untuk mempengaruhi sintesis protein dalam ribosom (Sawant, 2005). Ribosom bakteri terdiri dari dua sub unit yaitu 50S dan 30S sub unit (Harms *et al.*, 2003). Antibiotika dapat menghambat sintesis protein dengan beberapa tipe antara lain penghambat kode protein atau *A-site*. Tetrasiklin mengikat *A-site* yang berarti mencegah perpindahan tRNA (Harms *et al.*, 2003), sedangkan eritromisin mengikat *polypeptide export tunnel* dan menghambat perpanjangan rantai poli peptida (Sawant, 2005).

3) Penghambatan replikasi dan perbaikan DNA. *Fluoroquinolones* adalah antibiotika sintesis yang membunuh bakteri melalui target enzim *DNA gyrase* dan *topoisomerase* (Harmns *et al.*, 2003). *DNA gyrase* adalah enzim yang

bertanggungjawab untuk berhasilnya replikasi DNA. *Quinolones* mengikat enzim *DNA gyrase* sehingga replikasi DNA terganggu.



Gambar 2.10 Mekanisme kerja beberapa antibiotika (Sawant, 2005)

2.3.1.1 Antibiotika Betalaktam

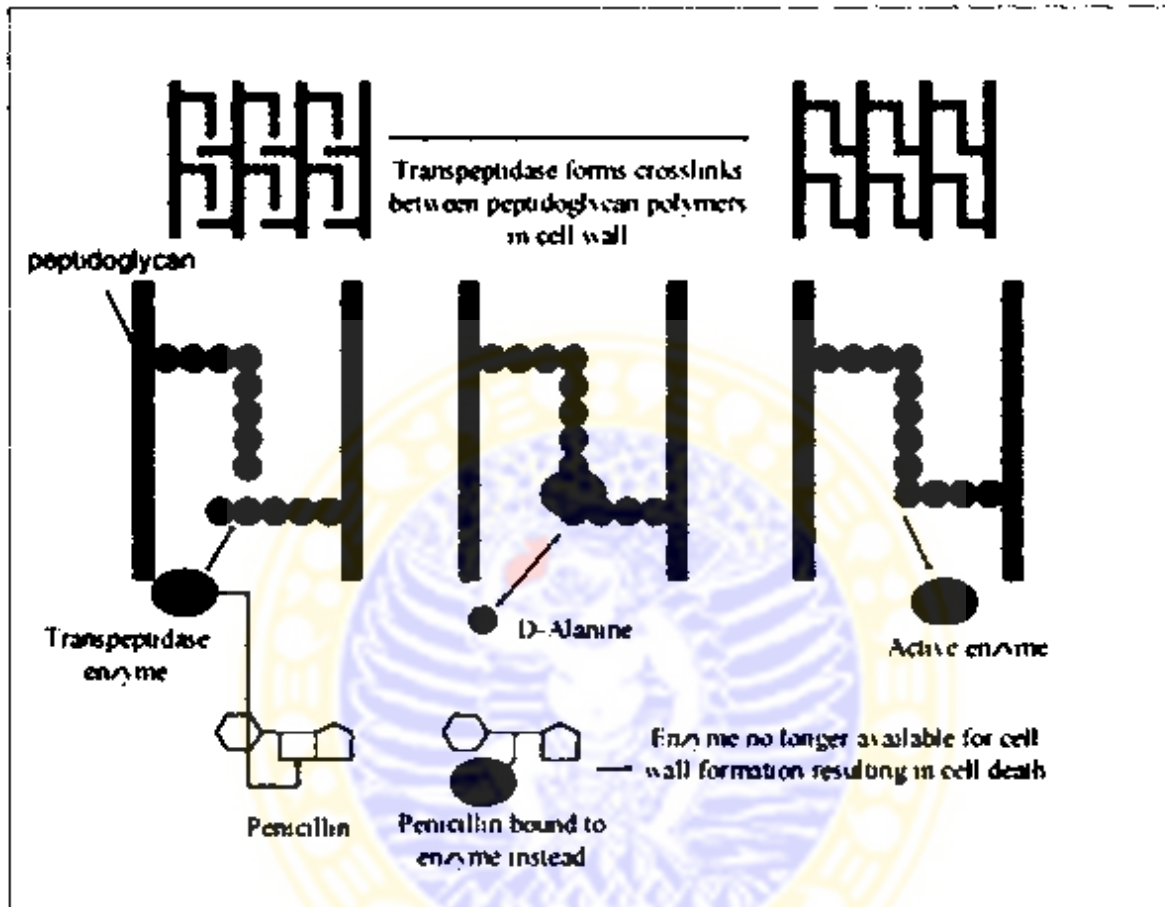
Penisilin merupakan sebuah kelompok dari antibiotika alami dan antibiotika semisintetik yang mempunyai cincin betalaktam dan merupakan bagian dari cincin *thiazolidine* (Yao and Moellering, 1991). Aksi dari antibiotika penisilin didasarkan pada kemampuan untuk menghambat sejumlah enzim dari bakteri yang dikenal sebagai *penicillin binding proteins* (PBPs) yang esensial untuk sintesis *peptidoglycan* (Yao and Moellering, 1991).

Antibiotika betalaktam menghambat pertumbuhan bakteri melalui *blocking* tahap awal pada sintesis dinding sel yang terkait secara *cross-linking* dengan polimer *peptidoglycan* oleh *transpeptidase* (gambar 2.11)(Sawant, 2005). Polimer *peptidoglycan* adalah bahan yang penting pada dinding bakteri yang dibentuk dengan pengantian residu dari *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic* (Walsh, 2000).

Penisilin G dan V adalah antibiotika betalaktam pertama yang diperkenalkan dan efektif melawan bakteri Gram positif, tetapi dalam beberapa tahun setelah dipasarkan, *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan penisilinase menampakkan resistensinya terhadap antibiotika tersebut (Sawant, 2005). Penisilin semi sintetik seperti ampisilin lebih efektif dibandingkan penisilin (Sawant, 2005), tetapi tahun 1965 terdapat sebuah *plasmid borne betalactamase* (TEM-1) yang bertanggung jawab atas resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap ampisilin, kemudian diikuti oleh SHV-1, TEM-2, dan OXA-1 yang juga merupakan *plasmid borne betalactamases* secara meluas tersebar ke populasi bakteri. Pada awal 1970, penyandi gen *AmpC beta lactamase* dari kromosom pertama kali dilaporkan yang dapat menginaktifkan ampisilin dengan cepat (Livermore, 1995).

Cephalosporin merupakan sebuah kelompok antibiotika yang termasuk derivat dari produk fermentasi dari jamur *Cephalosporium* (Yao and Moellering, 1991). Struktur dari cephalosporin terdiri dari sebuah cincin betalaktam yang merupakan bagian dari cincin dihidrothiazine. *Cephalosporin* mengikat PBPs,

berarti juga menghambat pembentukan sintesis *peptidoglycan* untuk pembentukan dinding bakteri (Taylor, 2001).



Gambar 2.11 Penghambatan antibiotika betalaktam pada sintesis dinding sel (Sawant, 2005)

Cephalosporin sering diklasifikasikan berdasarkan gambaran umum aktivitas antibakterialnya. Generasi pertama *cephalosporin* mempunyai aktivitas yang sangat kuat terhadap Gram positif dan moderat aktivitas terhadap Gram negatif (Taylor, 2001). Pengembangan *cephalosporin* yang dikombinasikan

dengan ampisilin untuk mengimbangi enzim yang dihasilkan oleh bakteri seperti *staphylococcal penicilinase* (Livermore, 1995), tetapi mempunyai kelemahan untuk mengimbangi enzim yang disandi *AmpC* dari kromosom dan enzim TEM dan SHV dari plasmid.

Generasi kedua *cephalosporin* beraksi melawan betalaktamase tertentu yang ditemukan dalam Gram negatif. *Cephalosporin* seperti *cefoxitime*, *cefuroxime* dan *cefamandole* dapat mengimbangi enzim TEM-1 tetapi kurang efektif menghadapi enzim yang disandi dari kromosom seperti *AmpC* betalactamase (Sawant, 2005).

Generasi ketiga *cephalosporin* umumnya kurang efektif melawan Gram positif yang berbentuk kokus (Taylor, 2001), tetapi lebih efektif melawan *enterobacteriaceae* (Taylor, 2001) dan berfungsi secara efektif menghadapi enzim yang dihasilkan plasmid maupun yang dihasilkan kromosom (Sawant, 2005)

2.3.1.2 Antibiotika Makrolida dan Linkomisin

Kelompok antibiotika ini terdiri dari eritromisin, spiramisin dan trioleandomisin dengan rumus bangun serupa yaitu cincin lakton besar yang mengikat satu atau lebih derivat gula. Linkomisin dan derivatnya klindamisin secara kimiawi tidak berhubungan, tetapi mirip sekali aktivitas dan mekanisme kerjanya dan cara terjadinya resistensi, bahkan menunjukkan resistensi silang. Dari antibiotika yang termasuk di dalam kelompok ini yang masih sering digunakan adalah eritromisin dan klindamisin.

Eritromisin dihasilkan oleh *Streptomyces erythreus* dan berkasiat bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif dengan spektrum kerjanya mirip penisilin (Tjay dan Rahadja, 1986). Dapat bekerja sebagai bakterisida tergantung dari dosis, penyebab infeksi dan lamanya kontak. Mekanisme kerjanya melalui perintangian sintesis protein.

Eritrosin diurai oleh asam lambung, maka telah dibuat beberapa ester yang tahan asam seperti stearat, estolat dan etilsuksinat. Ekskresi eritromisin mirip dengan tetrasiklin tetapi lebih cepat dengan melalui feses, empedu dan ginjal dalam bentuk yang inaktif.

2.3.1.3 Antibiotika Fluoroquinolone

Fluoroquinolone adalah agen antimikrobal yang baru dalam penggunaan klinis karena mekanisme kerjanya langsung menghambat sintesis DNA (Hooper, 2001). Penghambatan tampaknya terjadi oleh interaksi obat dengan gugusan DNA yang menjadi target dua enzim yaitu *DNA gyrase* dan *topoisomerase IV*. Enzim ini secara struktural terkait satu sama lainnya, keduanya berbentuk tetramerik dengan pasangan dua subunit yang berbeda. GyrA dan GyrB adalah subunit dari *DNA gyrase* dan homolog dengan ParC dan ParE yang merupakan subunit dari *topoisomerase IV*. Kedua enzim adalah termasuk tipe 2 topoisomerase yang beraksi dengan mematahkan *strand* DNA, melewati segmen lainnya dan menambal kembali patahan tersebut. Untuk *DNA gyrase*, *topoisomerization reaction* menghasilkan *DNA supercoils* yang berakibat penghambatan inisiasi replikasi DNA. Untuk topoisomerase IV,

topoisomerization reaction menghasilkan separasi *interlocking DNA* yang seharusnya berkembang dalam replikasi DNA (Hooper, 2001). Berkaitan dengan kerja kedua enzim tersebut tampaknya fluoroquinolone menghambat kerja enzim dan membentuk hambatan fisik dalam gerakan *RNA polymerase* dan *DNA helicase* yang ujungnya berakibat kematian sel (Willmott *et al*, 1994).

2.3.1.4 Antibiotika Tetrasiklin

Tetrasiklin menampakkan aktifitas yang berspektrum luas dalam melawan mikroorganisme patogen, dengan sifat diabsorpsi dengan baik, rendah toksisitasnya dan relatif murah harganya (Moellering, 1990). Hal ini menyebabkan penggunaan antibiotika yang meluas tetrasiklin untuk pengobatan manusia maupun hewan dan juga digunakan sebagai bahan tambahan dalam pakan hewan ternak dan hewan kesayangan (Michalova *et al*, 2004). Tetrasiklin digunakan secara meluas dalam kedokteran hewan utamanya untuk pengobatan penyakit gastrointestinal, pernafasan, infeksi kulit oleh bakteri, saluran *genito-urinary*, infeksi sistemik dan sepsis (Prescott *et al*, 2000).

Tetrasiklin dengan kadar di bawah dosis terapi sering digunakan sebagai pakan tambahan yang berfungsi sebagai promosi pertumbuhan dalam peternakan sapi, babi, domba dan ayam (Schwart *et al*, 1998). Negara yang termasuk Uni Eropa melarang penggunaan tetrasiklin sebagai faktor promosi pertumbuhan dalam pakan hewan sejak tahun 1975 (Prescott *et al*, 2000).

Tetrasiklin masuk melalui dinding bakteri dengan difusi pasif dan melalui membran sitoplasma dengan proses yang membutuhkan sebuah energi

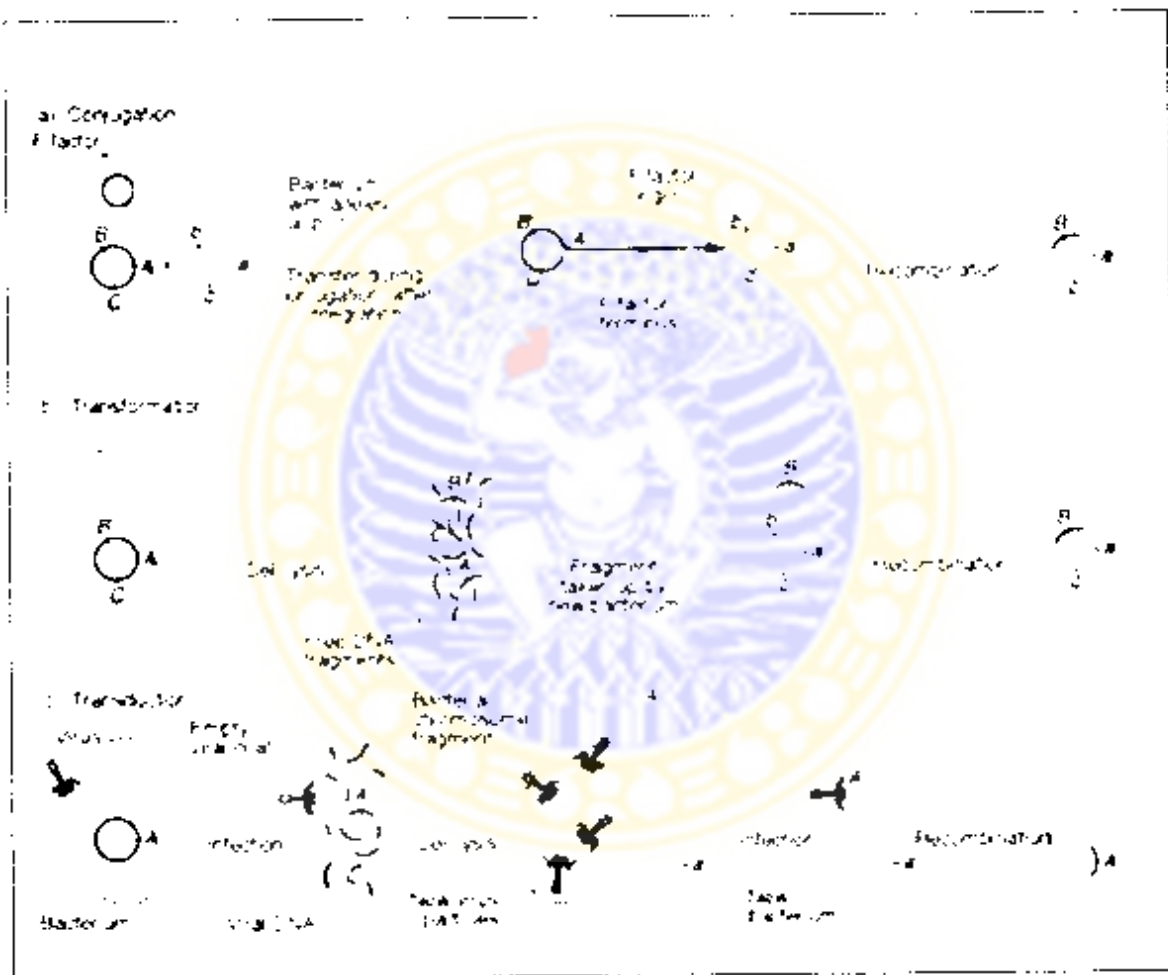
(Michalova *et al*, 2004). Aktifitas antibakterial tetrasiklin terkait dengan penghambatan *reversible* pada sintesis protein. Pengikatan tetrasiklin ke ribosom mencegah perlekatan *aminoacyl-tRNA* ke ribosom. Tetrasiklin mengikat secara langsung 30S-subunit protein S7 (Goldman *et al*, 1983) dan juga protein ribosomal lainnya (S3, S14 dan S19) (Buck and Cooperman, 1990). Beberapa dari 16S-rRNA juga penting dalam pengikatan tetrasiklin ke ribosom (Michalova *et al*, 2004).

2.4 Resistensi Terhadap Antibiotika

Resistensi terhadap antibiotika diantara bakteri patogen telah meningkat dalam dekade terakhir ini. Kebanyakan terkait dengan a) penggunaan yang berlebihan; b) penggunaan antibiotika spektrum luas yang tidak terkontrol; c) standar yang rendah untuk identifikasi bakteri penyebab infeksi; d) adanya transmisi dari *strain* yang resisten (Sawant, 2005).

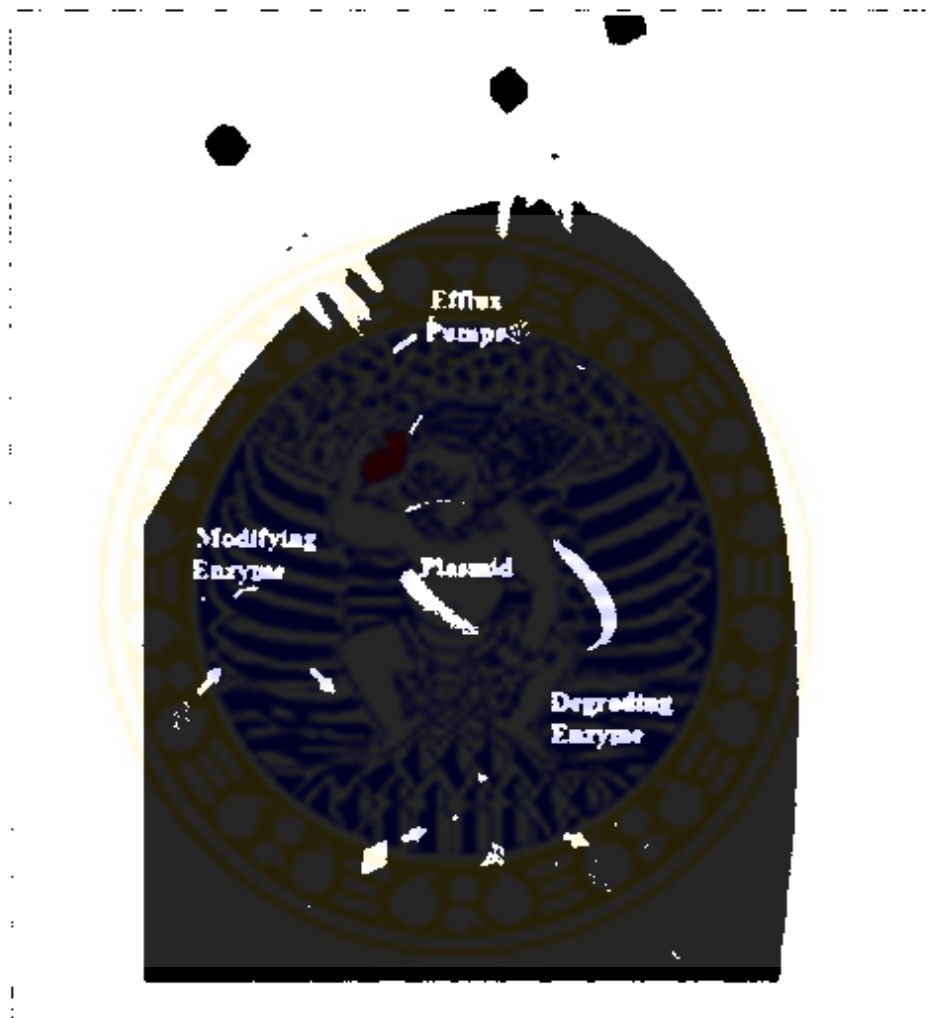
Resistensi terhadap antibiotika dapat diperoleh secara intrinsik dan secara perolehan. Resistensi intrinsik selalu ada dalam suatu bakteri (Thomsberry, 1991), sebagai contoh bakteri Gram negatif resisten terhadap *cloxacillin* dan *vancomycin* yang disebabkan karena dinding sel Gram negatif dilapisi oleh membran luar *lipoprotein-lipocaccharide-phospholipid* yang mencegah dinding sel dari beberapa antibiotika dan enzim *lysozyme*. Peningkatan gejala klinis yang nyata merupakan resistensi perolehan bakteri yang sebelumnya sensitif menjadi resisten. Bakteri dapat memperoleh resistensi melalui mutasi kromosom atau mendapat materi genetik seperti plasmid atau

transposons yang mengandung gen resisten terhadap antibiotika. Perpindahan plasmid resistensi dari mikroorganisme satu ke mikroorganisme lainnya dapat menyebarkan resistensi secara luas. Perubahan pola resistensi dapat terjadi setelah bakteri terpapar oleh antibiotika yang lama atau dapat muncul selama pengobatan penyakit infeksi (Sawant, 2005).

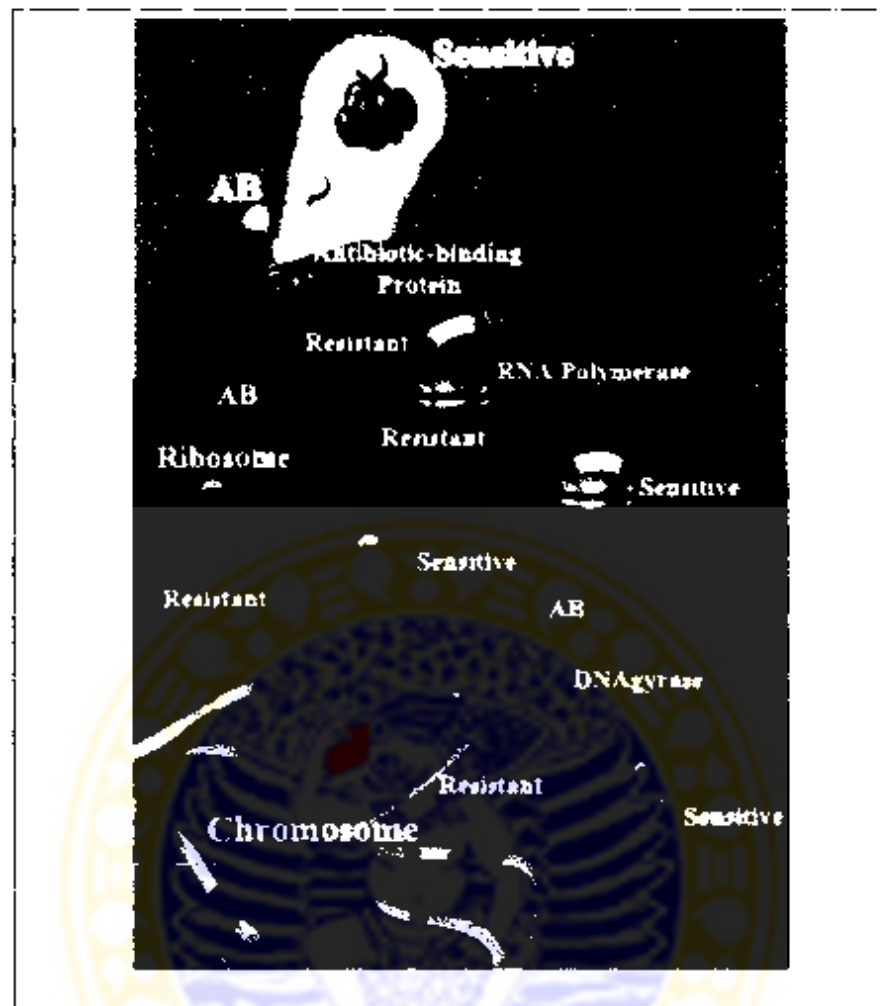


Gambar 2.12 Proses perpindahan gen resistensi terhadap antibiotika (Walsh, 2000)

Perpindahan gen horizontal adalah mekanisme yang memungkinkan bakteri untuk menggunakan materi genetik secara bersama yang menyebabkan perpindahan resistensi antibiotika meliputi *conjugation*, *transduction* dan *transformation* (Rice, 2000) (gambar 2.12).



Gambar 2.13 Perpindahan resistensi antibiotika pada bakteri melalui plasmid. Transfer resistensi antibiotika dari bakteri satu ke lainnya dapat menggunakan perantara plasmid bakteri. Yang termasuk mekanisme melalui plasmid bakteri adalah pompa aktif keluar, enzim yang memodifikasi antibiotika dan enzim yang mendegradasi antibiotika (bentuk antibiotika digambarkan warna hijau kotak). (Khachatourians, 1998)

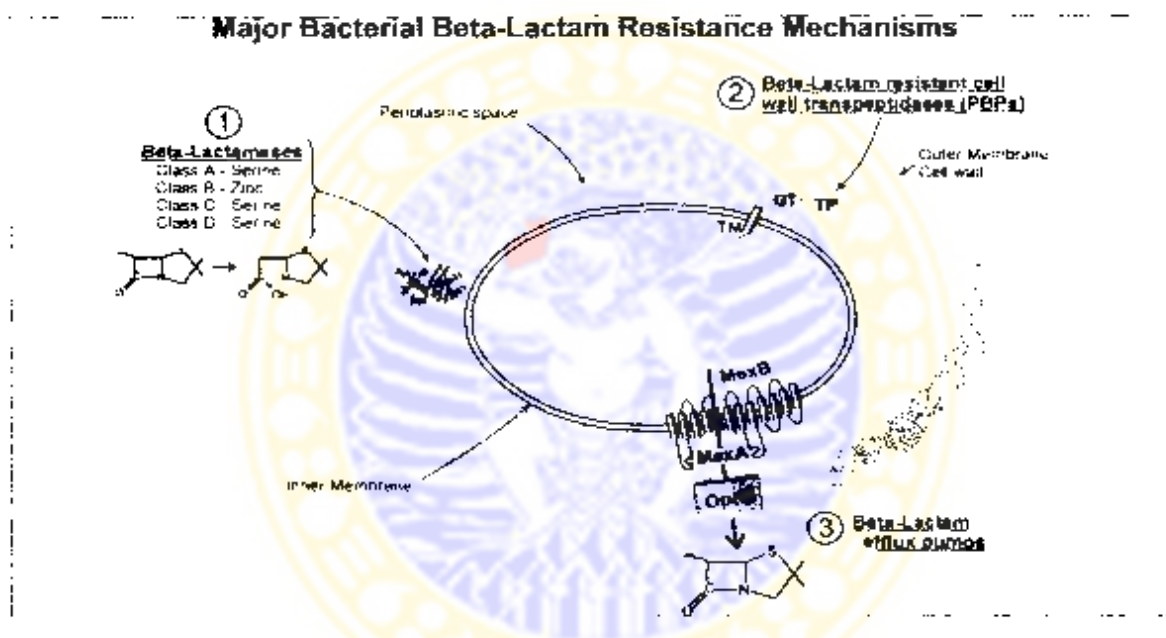


Gambar 2.14 Resistensi antibiotika melalui mutasi kromosom dalam bakteri. Mutasi kromosom dalam bakteri dapat melakukan perubahan pada target antibiotika dengan menolak untuk berikatan dengan antibiotika. Target tersebut termasuk *antibiotic-binding proteins*, *Ribosome*, *RNA polymerase* dan *DNA gyrase* (bentuk keempat lingkaran menggambarkan interaksi antibiotika dengan komponen sel bakteri yang sensitif). (Khachatourians, 1998)

Mekanisme resistensi terhadap antibiotika dikelompokkan menjadi a) penurunan penetrasi melalui membran bakteri, b) inaktivasi antibiotika, c) perubahan tempat target dan d) pemompaan keluar secara aktif

antibiotika dari bakteri (Taylor, 2001). Obat dengan kelas yang mirip mempunyai kesamaan mekanisme resistensi dan sering terjadi *cross-resistance*.

Mekanisme resistensi terhadap antibiotika yang umum adalah produksi enzim yang menginaktivasi atau memodifikasi antibiotika. Sebagai contoh adalah produksi betalaktamase oleh beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa golongan betalaktamase dapat menyebabkan degradasi antibiotika betalaktam (penisilinase, *cephalosporinase*) (gambar 2.13).



Gambar 2.15 Mekanisme resistensi utama antibiotika betalaktam

Keterangan: Tiga mekanisme resistensi betalaktam yang utama dalam bakteri. Pertama cincin betalaktam pecah dengan reaksi hidrolisa yang disebabkan betalaktamase. Kedua PBP2a dan betalaktam yang resistan TM (*N-terminal transmembrane helix*), GT (*membrane associated glycosyl-transferase*), dan TP (*C-terminal transpeptidase*). Ketiga MexA,B-OprM dari betalaktam dipompa keluar (*efflux pump*). (Walsh, 2000)

Mekanisme bakteri menjadi resistan terhadap antibiotika sering merefleksikan mekanisme antibiotika dalam membunuh bakteri. Setelah

antibiotika penetrasi ke dalam dinding sel atau membran dari bakteri, yang menjadi target adalah enzim bakteri sebagai contoh *penicillin binding protein* atau *DNA gyrase* atau ribosom yang berpengaruh pada sintesis protein atau replikasi (gambar 2.14).

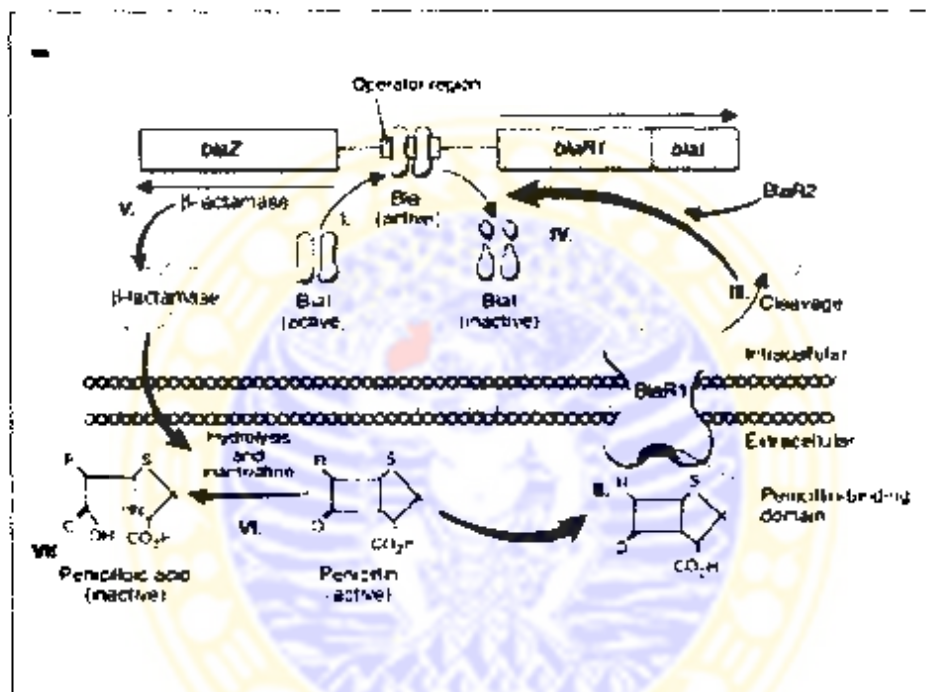
Pergantian dalam tempat target adalah mekanisme yang umum lainnya, antibiotika betalaktam mengikat PBPs yang merupakan enzim yang terkait dalam sintesis dinding sel bakteri. Melalui pengikatan PBPs, antibiotika mengintervensi sintesis dinding sel yang menyebabkan penghambatan dalam pembelahan sel bakteri. Perubahan dalam PBPs dapat menyebabkan perkembangan resistensi terhadap antibiotika betalaktam seperti *methicillin resisten Staphylococcus aureus*. Mekanisme utama dari antibiotika betalaktam digambarkan dalam gambar 2.15.

2.4.1 Dasar Genetik Untuk Resistensi Terhadap Antibiotika

Resistensi staphylococci terhadap antibiotika betalaktam merupakan hasil degradasi enzimatis cincin betalaktam oleh betalaktamase atau oleh ekspresi PBP yang beraffinitas rendah. Setelah introduksi antibiotika penisilin, plasmid yang membawa gen *blaZ* yang mengkode betalaktamase tampak terdeteksi pada isolat *Staphylococcus aureus* hampir di seluruh dunia. Ekspresi dari gen *blaZ* di regulasi naik oleh produksi gen *blaI* dan *blaR1* dalam merespon penisilin (gambar 2.16).

Analog terhadap operon betalaktamase, PBP2a dapat berekspresi terhadap respon antibiotika betalaktam. Gen *mecI* dan *mecR1* menyebabkan

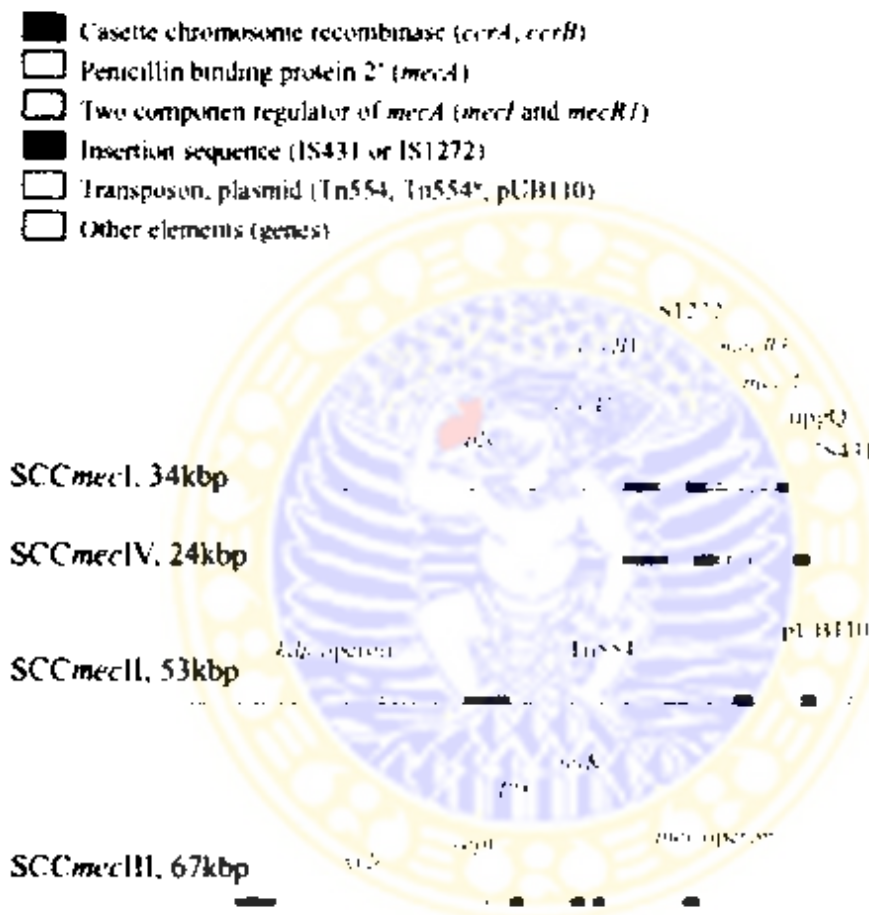
ekspresi PBP2a ketika ada antibiotika tertentu seperti penisilin dan *cephalosporin*. Gen *mecR1* mengkode reseptor dalam membran sitoplasma dan meneruskan signal yang menyebabkan depresi PBP2a dengan dilepaskannya protein represor *mecI* dari daerah operator gen *mecA*. Mayoritas antibiotika betalaktam lemah mempengaruhi PBP2a karena rendahnya affinitas pada sensor *mecR1*.



Gambar 2.16 Proses resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika betalaktam (Lowy, 2003)

Gen *mecA* ditemukan di dalam DNA kromosomal yang disebut *Staphylococcal Chromosome Cassette mec* (SCC*mec*) (gambar 2.17). Ukuran SCC*mec* berkisar dari 21 sampai 67 kb atau sekitar 1 – 2% dari seluruh genome *Staphylococcus aureus*. Di dalam *mec locus*, mungkin mengandung

beberapa gen resistensi, faktor adhesi dan banyak *open reading frames* (ORF). Transposon Tn554 mengkode resistensi terhadap makrolida, streptogramin B dan klindamisin, plasmid pUB 110 mengkode resistensi terhadap aminoglikosida, plasmid pT181 mengkode resistensi terhadap tetrasiklin (Wielders, 2002).



Gambar 2.17 *Staphylococcal Chromosome Cassette mec* (SCC*mec*). (Wielders, 2002)

Staphylococcal Chromosome Cassette mec (SCC*mec*) adalah elemen genetik bergerak. Terbukti bahwa SCC*mec* tidak mengandung phage, *tranposases* dan gen *tra* yang ketiganya termasuk elemen genetik bergerak

yang mengkode *invertase*. Enzim *invertase* disebut *cassette chromosome recombinase A dan B (ccrA dan ccrB)* yang berfungsi sebagai *recombinant multicopy plasmid* yang dimasukkan ke dalam sel baru (Wielders, 2002).

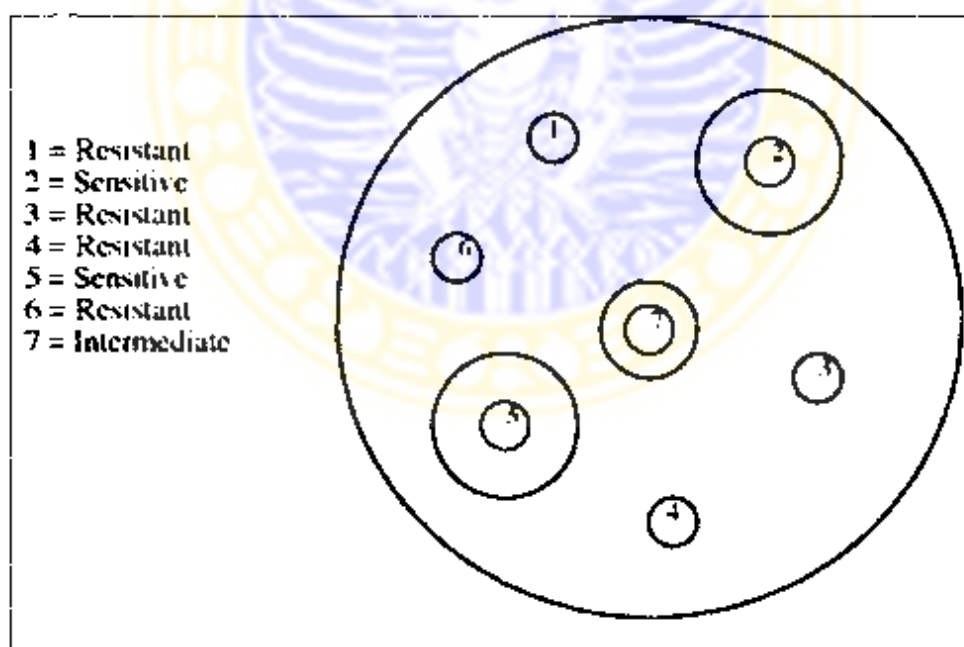
SCCmec diintegrasikan pada tempat yang unik (*attB_{sc}*), berlokasi antara *spa* dan *pur* pada genome *Staphylococcus aureus*. Tempat *attB* terkonservasi dengan baik pada setiap strain *Staphylococcus aureus*. Paling tidak saat ini ditemukan tipe *SCCmec* sebanyak empat tipe yang bertanggung jawab terhadap penentuan resistensi terhadap antibiotika.

2.5. Pengujian Resistensi Terhadap Antibiotika

Tujuan dari uji *antimicrobial susceptibility* adalah untuk memprediksi secara *in vivo* sukses atau tidaknya suatu pengobatan. Pengujian dirancang untuk mengukur respon pertumbuhan dari sebuah isolat mikroorganisme yang terpapar antibiotika tertentu di bawah kondisi baku. Hasil dari uji *antimicrobial susceptibility* harus dikombinasikan dengan informasi klinis dan pengalaman ketika memberikan antibiotika yang cocok (Thomsberry, 1991). Metode *disk diffusion (Kirby Bauer disk assay)* merupakan sistem yang tepat untuk pengujian beberapa antibiotika dari suatu isolat bakteri (Thornsberry, 1991). Pertumbuhan mikroorganisme dan difusi antibiotika secara serempak menghasilkan zona inhibisi yang bundar. Diameter zona inhibisi adalah fungsi dari suatu antibiotika dalam disk dan kepekaan dari mikroorganisme. Pengujian ini harus baku dengan tepat karena zona tergantung pada jumlah inokulum, komposisi media, temperatur inkubasi, kelembaban dan ketebalan agar (Taylor, 2001). Jika

kondisinya terkendali dengan baik, pengujian dapat dilaksanakan dan diameter zona adalah fungsi dari kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotika. Diameter zona dapat dikorelasikan dengan kepekaan suatu mikroorganisme terhadap antibiotika yang diukur dengan metode difusi. Selanjutnya korelasi menetapkan mikroorganisma tersebut sensitif, *intermediate* dan resisten terhadap konsentrasi tertentu dari antibiotika (gambar 2.18)(Livermore *et al*, 2001).

Kategori sensitif berakibat bahwa suatu infeksi dapat diobati dengan dosis biasa dari antibiotika yang diuji untuk tipe infeksi yang sedang berjalan secara klinis. Kategori resisten memberi prediksi gagalnya pengobatan dengan antibiotika tersebut (Livermore, 2001). Kategori *intermediate*, merupakan zona antara kategori sensitif dan kategori resisten.



Gambar 2.18 Interpretasi Hasil Metode *Kirby Bauer Disk Diffusion*

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan pada konsep dasar epidemiologi veteriner yang menekankan pada keseimbangan antara agen penyakit, hospes dan lingkungan dalam memahami timbulnya suatu penyakit dengan merujuk kasus mastitis pada sapi perah. Terjadinya keadaan penyakit tersebut disebabkan oleh adanya perubahan agen penyakit yang menjadi ganas atau hospes kondisinya berubah menjadi lemah. Perubahan dari penyakitnya sendiri dapat disebabkan oleh virulensinya meningkat, mutasi, rekombinasi, modifikasi dan perubahan lainnya. Pada umumnya perubahan ini disebabkan oleh pengaruh lingkungan. Sedangkan perubahan hospes berupa turunnya daya tahan disebabkan oleh faktor stress atau pengaruh lingkungan lain yang mengakibatkan kondisi tubuh hospes menurun. Bisa pula terjadi karena genetik, seperti akibat *inbreeding*. Sebaliknya hospes yang mudah terinfeksi oleh agen penyakit dapat juga berubah menjadi lebih tahan, hal ini biasanya disebabkan oleh adanya peningkatan respon imun pada hospes. Daya tahan ini dapat terjadi dengan meningkatkan ketahanan melalui genetik yaitu dengan perlakuan kawin silang atau secara alami oleh hospes yang secara bertahap membuat kekebalan tubuhnya sendiri yang biasa terjadi pada hospes yang sering kontak dengan agen penyakit.

Agen penyakit mastitis pada sapi perah dipengaruhi oleh dua faktor penting yaitu faktor lingkungan luar yang berupa perbedaan geografi dan suhu lingkungan, dan faktor lingkungan dalam hospes yang berupa tingkat respon imun hospes maupun kadar antibiotika dalam darah pada hospes. Salah satu agen penyakit yang sering menimbulkan mastitis pada sapi perah adalah *Staphylococcus aureus*.

Pada tahap awal infeksi, sering tidak menimbulkan manifestasi klinis dan baru memberikan manifestasi klinis bila proses ini berjalan lanjut dengan diikuti berbagai kerusakan komponen alveoli di dalam ambing sapi perah. Akibat dari keadaan ini menimbulkan kelainan kualitas dan kandungan susu yang dihasilkannya yang terdeteksi secara jelas.

Hal ini menunjukkan bahwa pada mastitis subklinis regulasi gen virulensinya berbeda dengan mastitis klinis. Perbedaan ini didasarkan pada proses infeksi maupun kerapatan bakterinya. Untuk itu identifikasi gen virulensi yang terkait dengan mastitis oleh *Staphylococcus aureus* merupakan sebuah langkah penting dalam memahami proses terjadinya penyakit mastitis. Hal ini disebabkan gen virulensi *Staphylococcus aureus* sangat terkait dengan faktor lingkungan, baik lingkungan makro maupun lingkungan mikro (Wisell, 2000).

Staphylococcus aureus mempunyai kemampuan menyebabkan berbagai macam penyakit pada manusia mulai abses permukaan sampai infeksi sistemik seperti *osteomyelitis*, endokarditis ataupun septikemia, sedangkan pada sapi perah terutama menyebabkan mastitis. Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* sangat sulit untuk dikontrol oleh pengobatan (Jones,

1998), dan angka kejadian mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* merupakan angka kejadian tertinggi (Morin and Hurley, 2003). Kemampuan menyebabkan penyakit ini terkait dengan sejumlah enzim pencernaan dan juga protein permukaan yang mengikat berbagai molekul hospes. Hal ini disebut sebagai faktor virulensi yang kemungkinan disintesis dalam *operon agr* untuk merespon kebutuhan yang spesifik selama proses infeksi.

Dua sistem regulasi untuk pembentukan faktor virulensi pada *Staphylococcus aureus* yaitu *agr* (*accessory gene regulator*) dan *sar* (*staphylococcal accessory regulator*). Kedua sistem regulasi dipengaruhi oleh lingkungan, baik lingkungan mikro seperti kerapatan bakteri, kadar garam ataupun lingkungan makro seperti perbedaan letak geografi ataupun perbedaan suhu sekitarnya (Wisell, 2000).

Locus agr mengkode dua sistem signal transduksi yang merespon terhadap kerapatan bakteri dan mengontrol paling tidak 25 faktor virulensi yang berbeda. Molekul efektor dari sistem *agr* adalah RNA III. *Locus sar* juga meregulasi beberapa gen yang bertanggung jawab pada virulensi *Staphylococcus* dengan jalan memodulasi aktivitas *agr*, tetapi sebagian melalui mekanisme selain *agr*. Molekul efektor dari sistem *sar* adalah *sar A*.

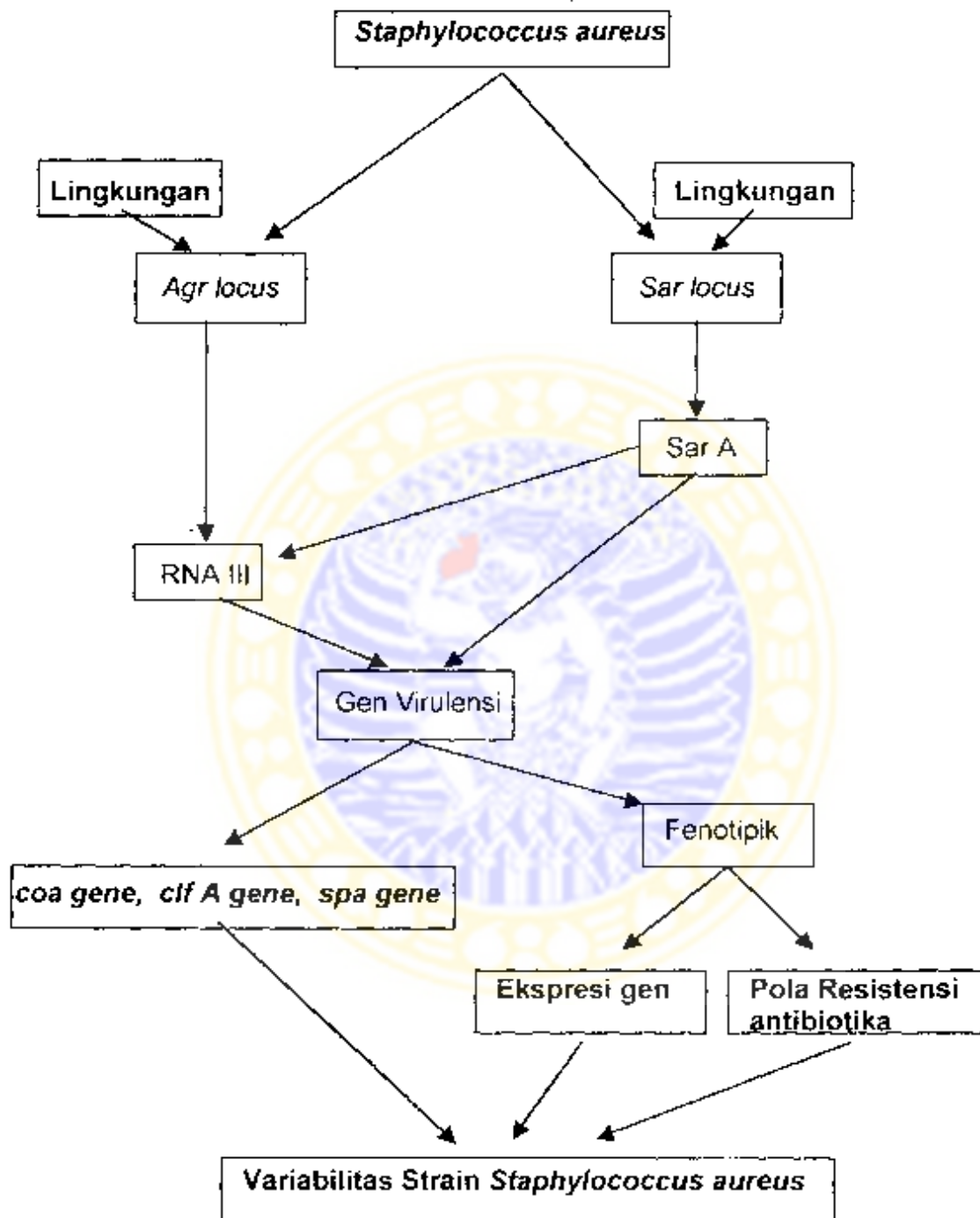
Kebanyakan gen yang diregulasi oleh *sar A* juga diregulasi oleh RNA III, sehingga diasumsikan ada interaksi antara RNA III dan homolog dari *Sar*. RNA III juga mungkin mempunyai afinitas yang berbeda dengan protein *Sar*.

Virulensi *Staphylococcus aureus* dipengaruhi oleh kemampuan perlekatan pada sel hospes, antara lain ditentukan oleh gen penyandi protein

permukaan bakteri yang dalam hal ini antara lain adalah gen penyandi protein A, koagulase dan *clumping factor*. Pada proses infeksi yang diawali oleh perlekatan *Staphylococcus aureus* pada sel alveoli jaringan ambing sapi perah sampai timbulnya ekspresi dari gen penyandi protein permukaan bakteri yang dapat mengakibatkan invasi *Staphylococcus aureus* ke jaringan yang lebih dalam dan juga dapat mengakibatkan adanya interaksi yang saling mempengaruhi antara sel hospes dan bakteri. Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* juga merupakan hasil interaksi antara kemampuan pertahanan diri sel hospes yang melibatkan sistem pertahanan seluler maupun humoral dengan faktor virulensi dari sel bakteri *Staphylococcus aureus*.

Proses interaksi antara sel hospes dan bakteri yang juga dipengaruhi oleh lingkungan sekitarnya menghasilkan perbedaan genotipik maupun fenotipik intra spesies bakteri tersebut yang terjabarkan dengan adanya variabilitas strain *Staphylococcus aureus*. Lingkungan tempat interaksi yang terdiri dari lingkungan mikro seperti konsentrasi antibiotika dalam darah ataupun kerapatan bakteri serta lingkungan makro seperti suhu udara dan keadaan geografis yang menurut hipotesis dapat mempengaruhi pola resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika interaksi ini dapat digambarkan dalam kerangka konseptual sebagai berikut :

1.2 Bagan Kerangka Konseptual.



3.3 Hipotesis.

Berdasarkan rumusan masalah, kajian teori dan kerangka konseptual, maka hipotesis penelitian adalah :

Terdapat perbedaan pengaruh lingkungan makro seperti perbedaan lokasi peternakan sapi perah pada dataran tinggi dengan dataran rendah yang merupakan perbedaan geografi dengan suhu lingkungan yang berbeda maupun perbedaan pengaruh lingkungan mikro terhadap gen virulensi *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari manifestasi mastitis klinis dan mastitis subklinis pada sapi perah di Jawa Timur.

Adapun penjabaran dari hipotesis ini adalah :

1. Terdapat perbedaan sensitivitas *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis terhadap antibiotika dari antara peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian : Penelitian ini merupakan penelitian observasional lapangan yang menggunakan pendekatan survey. Dalam rangka membuktikan hipotesis, strategi penelitian ini dapat dibayangkan melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

1. Deteksi kejadian mastitis pada sapi perah di Jawa Timur dengan alat screening *California Mastitis Test (CMT)*.
2. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kriteria laboratorium yaitu mikroskopis berbentuk kokus, Gram +, katalase +, koagulase +, hemolisis β .
3. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan pendekatan genotipik gen penyandi protein permukaan bakteri antara lain adalah protein A, koagulase dan *clumping factor*.
4. Karakterisasi *Staphylococcus aureus* melalui ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri.
5. Karakterisasi *Staphylococcus aureus* melalui metode *disk diffusion* untuk uji sensitivitas antibiotika.

4.2 Populasi, Metode Sampling, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi target adalah sapi perah yang menderita mastitis di Jawa Timur.

4.2.2 Metode Sampling menggunakan metode **Cluster Sampling**. Pemilihan metode tersebut didasarkan adanya konsentrasi peternakan di daerah tertentu dan tidak menyebar merata. Berdasarkan pada data yang ada (lampiran 12) maka peternakan yang mempunyai populasi besar dipilih yaitu Peternakan sapi perah Surabaya, Grati, Batu dan Nongkojajar. Sampel dari peternakan yang terpilih juga diambil dari tempat kantong peternakan sapi perah tersebut dengan kriteria sapi perah yang menderita mastitis.

4.2.3 Besar Sampel menggunakan hitungan $n = 4 P (1 - P) / L^2$

dimana n adalah ukuran sampel, P adalah prevalensi mastitis sebanyak 80% dan L adalah tingkat kesalahan yang diperbolehkan sebanyak 5% (Martin, Meek and Willeberg, 1987), sehingga didapatkan besaran sampel yang digunakan adalah : 256 ekor sapi. Melalui penggunaan metode proporsional didapatkan besar sampel untuk peternakan sapi perah Batu sebanyak 71 ekor, peternakan sapi perah Nongkojajar sebanyak 98 ekor, peternakan sapi perah Grati sebanyak 117 dan peternakan sapi perah Surabaya sebanyak 22 ekor. Jumlah sampel keseluruhannya adalah 308 ekor. Metode proporsional dengan merujuk jumlah produksi susu tiap peternakan di Jawa Timur yang dikeluarkan oleh data dari PT Nestle (lampiran 12).

4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel Susu

Sampel susu yang diperiksa merupakan susu yang dipancarkan kedua kali pada proses pengambilan susu, setelah puting susu diberi desinfektan. Sampel susu dikoleksi dari tiap puting sapi perah yang menderita mastitis (gambar 4.1).

Kriteria Sampel Penelitian

1. Sapi perah sedang dalam masa laktasi.
2. Diagnosis mastitis secara klinis.
3. Deteksi mastitis subklinis dengan uji CMT.
4. Penderita mastitis tidak sedang mendapat pengobatan antibiotika.



Gambar 4.1 Pengambilan susu sebagai sampel untuk uji CMT
(Department of Veterinary Science, 2005)

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Variabel bebas : Lokasi Peternakan Sapi Perah

Variabel tergantung penelitian tahap V : Zona resistensi terhadap antibiotika

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

Isolat *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini adalah isolat mumi perolehan dari pembiakan sampel susu sapi perah penderita mastitis pada MS Agar dengan koloni yang berwarna kekuningan, pada pemeriksaan mikroskopis berbentuk kokus bergerombol dan pewarnaan menunjukkan Gram positif dan bersifat hemolisis β pada agar darah, katalase positif, koagulase positif (Todar, 2002).

Coa gene adalah gen *Staphylococcus aureus* yang mengkode koagulase dengan berat molekul (BM) 600, 680, 740 dan 850 bp (Akineden *et al.*, 2001 and Salasia *et al.*, 2004).

clf A gene adalah gen *Staphylococcus aureus* yang mengkode protein permukaan untuk menyebabkan terjadinya penggumpalan darah dengan berat molekul 950 dan 1000 bp (Akineden *et al.*, 2001 and Salasia *et al.*, 2004).

spa gene adalah gen *Staphylococcus aureus* yang mengkode dalam produksi protein A pada permukaan bakteri dengan berat molekul 110 dan 220 bp (Akineden *et al.*, 2001 and Salasia *et al.*, 2004).

Ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri didasarkan pada pola berat molekul yaitu 86 kD, 55kD dan 40 kD yang merujuk pada ekspresi protein yang disandi oleh gen koagulase, protein A dan *clumping factor*.

Pola resistensi antibiotika adalah gambaran hasil uji resistensi dengan menggunakan cakram antibiotika yang terdiri dari Ampisilin 10 μ g, *Cephalexin* 30 μ g, Eritromisin 15 μ g, Ciproxin 5 μ g, Tetrasiklin 30 sapi μ g dan Penisilin 10 IU.

Lokasi peternakan adalah tempat peternakan yang diambil susunya sebagai sampel penelitian yaitu dari dataran rendah peternakan sapi perah Surabaya dan peternakan sapi perah Grati, sedangkan dari dataran tinggi adalah peternakan sapi perah Batu dan peternakan sapi perah Nongkojajar.

Dataran rendah merupakan dataran yang memiliki ketinggian 0 sampai 600 meter dari permukaan laut, sedangkan dataran tinggi memiliki ketinggian antara 600 meter sampai 800 meter dari permukaan laut (Yulir dan Widodo, 2003).

Mastitis subklinis adalah infeksi peradangan pada ambing sapi perah yang tidak menampilkan gejala klinik, dengan menggunakan alat CMT menunjukkan tingkat 0, 1, 2 dan 3 (Jones, 1998).

4.4 Bahan Penelitian

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

Uji untuk penentuan mastitis subklinis adalah California Mastitis Test yang merupakan standar uji untuk deteksi mastitis subklinis (Jones, 1998)

Bahan untuk menentukan isolat *Staphylococcus aureus* murni secara laboratoris adalah Pewarnaan Gram, *Mannitol Salt Agar*, *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 pembiakan bakteri dan pemecahan dinding sel : Lauryl broth, PBS

Bahan untuk electrophoresis SDS-PAGE adalah komposisi *separating 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 μ l Temed dan 30 μ l APS 10%), electrophorsis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest), *Lamlli buffer* , dan marker protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5 – 200 kDa produksi Bio Rad.

Bahan untuk pengujian sensitivitas antibiotika adalah media Mueller Hilton Broth (Oxoid), Mueller Hilton Agar (Oxoid) dan 6 macam cakram antibiotika dari Oxoid yaitu Ampisilin 10 μ g, *Cephalixin* 30 μ g, Eritromisin 15 μ g, *Ciproxin* 5 μ g, Tetrasiklin 30 μ g dan Penisilin 10 IU.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Deteksi dan Diagnosis Mastitis

Pemeriksaan dilakukan berdasarkan visualisasi dan palpasi pada ambing. Dalam kasus mastitis klinis, ambing menjadi keras, kemerahan dan hangat. Palpasi pada ambing menyebabkan sapi kesakitan. Gejala ini menunjukkan adanya perubahan sistem aliran darah di kelenjar susu ketika terjadi peradangan.

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

4.5.2 Koleksi sampel dan identifikasi

Sampel diperoleh dari susu sapi perah penderita mastitis di Jawa Timur. Sampel dibiakkan pada media MS agar dan dilanjutkan sub kultur pada agar darah. Identifikasi dilakukan berdasarkan bentuk mikroskopis (kokus bergerombol), sifat hemolisis (tipe β), katalase positif (gambar 4.2.), koagulase positif dan Gram positif.



Gambar 4.2 Uji Katalase

Keterangan : a. Uji katalase negatif karena tidak timbul gelembung udara.
b. Uji katalase positif karena timbul gelembung udara.
(Todar, 2002)

4.5.3 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* dinaktifkan dengan mendidihkan selama 10 menit.

4.5.4 Primer untuk gen penyandi faktor virulensi

Amplifikasi PCR ditujukan untuk mengamplifikasi gen penyandi faktor virulensi *Staphylococcus aureus* yang meliputi : *staphylococcal coagulase*, *clumping factor* dan protein A.

Urutan *oligonucleotida primers* yang digunakan untuk mengamplifikasi gen penyandi *staphylococcal coagulase* adalah Coa 1: ATA GAG ATG CTG GTA CAG G dan Coa 2: GCT TCC GAT TGT TCG ATG C dengan program *thermocycler* 30 kali (94° C , 1 menit, 58° C , 1 menit dan 72° C, 1 menit).

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi *clumping factor* adalah ClfA-1 : GGC TTC AGT GCT TGT AGG dan ClfA-2 : TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC dengan program *thermocycler* 35 kali (94° C , 1 menit, 57° C , 1 menit dan 72° C, 1 menit).

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).

4.5.5 Prosedur Amplifikasi PCR (Akineden *et al.*, 2001).

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 *microtube* 0,5 ml. Selanjutnya 2,5 μ l preparat DNA ditambahkan ke dalam tabung *microtube* tersebut, dan dimasukkan ke dalam *thermocycler*. Siklus untuk program *thermocycler* adalah sebagai berikut : untuk amplifikasi gen penyandi koagulase (94^oC untuk denaturasi selama 1 menit, *annealing* pada 58^oC selama 1 menit dan ekstensi pada 72^oC selama 1 menit) sebanyak 30 kali.

Amplifikasi gen penyandi *clumping factor* (94^oC untuk denaturasi selama 1 menit, *annealing* pada 57^oC selama 1 menit dan ekstensi pada 72^oC selama 1 menit) sebanyak 35 kali.

Amplifikasi gen penyandi protein A (94^oC untuk denaturasi selama 1 menit, *annealing* pada 58^oC selama 1 menit dan ekstensi pada 72^oC selama 1 menit) sebanyak 30 kali.

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

Agarose gel 2% dalam 1 x TAE *buffer* disiapkan dan hasil dari produk PCR sebanyak 12 μ l dicampur dengan *loading buffer*. Cairan tersebut dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose. Ditambahkan 100 bp *ladder* yang digunakan sebagai *marker*. Proses elektroforesis dihentikan jika *loading buffer*

sudah bermigrasi paling tidak 8 cm. Selanjutnya diwarnai dengan *ethidium bromide*. Visualisasi fragment DNA yang terbentuk dengan menggunakan UV transilluminator.

4.5.7 Pembiakan Bakteri dan Pemecahan Dinding Sel Bakteri

Isolat *Staphylococcus aureus* dibiakan dalam *Lauryl broth* 300 ml dan diinkubasikan pada suhu 37°C dan 42°C selama 24 jam. Sampel disentrifuge 2 kali untuk mendapatkan *pellet* bakteri. *Pellet* dicuci dengan *Phenol Buffer Saline* (PBS) sebanyak 2 kali dan disentrifuge untuk mendapatkan *pellet* yang bersih. *Pellet* bakteri kemudian diberi PBS divortex dan dilanjutkan dengan pemecahan dinding sel bakteri dengan bantuan alat sonikator. Hasil pemecahan dinding sel bakteri disentrifuge dengan kecepatan tinggi. *Supernatan* ditampung untuk analisis karakterisasi protein permukaan bakteri.

4.5.8 Analisis Protein dengan SDS-PAGE

Analisis protein dilakukan dengan tehnik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating 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%). 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 *Lammi buffer* pada pemanasan 100° C selama 5 menit,

dimasukkan ke dalam sumuran *separating 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 *separating gel*, dan proses elektroforesis memerlukan waktu sekitar 3 - 4 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 pewarna perak nitrat 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 perak nitrat kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10%.

Hasil visualisasi protein dapat dianalisis dengan metode analisis regresi membandingkan antara penanda protein dengan *band* protein yang dicari (lampiran 10 dan 11).

4.5.9 Uji sensitivitas *in vitro*

Pengujian sensitivitas terhadap enam antibiotika dilakukan dengan menggunakan metode difusi dari Kirby Bauer. Media yang digunakan untuk menguji adalah media Mueller Hilton Broth (Oxoid), Mueller Hilton Agar (Oxoid)

dan 6 macam cakram antibiotika dari Oxoid yaitu Ampisilin 10 µg, *Cephalexin* 30 µg, Eritromisin 15µg, *Ciproxin* 5 µg, Tetrasiklin 30µg dan Penisilin 10 IU.

4.6 Analisis Data

Pengaruh lokasi peternakan terhadap adanya perbedaan besar molekul gen penyandi faktor virulensi pada *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan melihat *band* yang terbentuk dari *fragment* DNA dan diukur dengan marker.

Pengaruh lokasi peternakan terhadap ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dilakukan dengan melihat pola *band* yang terbentuk dari protein yang terekspresikan dan diukur dengan marker dengan analisis regresi.

Pengaruh lokasi peternakan terhadap pola resistensi antibiotika dianalisis dengan pendekatan ANOVA berdasarkan diameter zona yang dihasilkan jika pada uji normalitas sampel dengan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan sampel dengan distribusi yang normal. Tetapi jika diuji normalitas menunjukkan sampel dengan distribusi yang tidak normal maka dianalisis dengan pendekatan uji Kruskal-Wallis.

4.7 Lokasi Penelitian

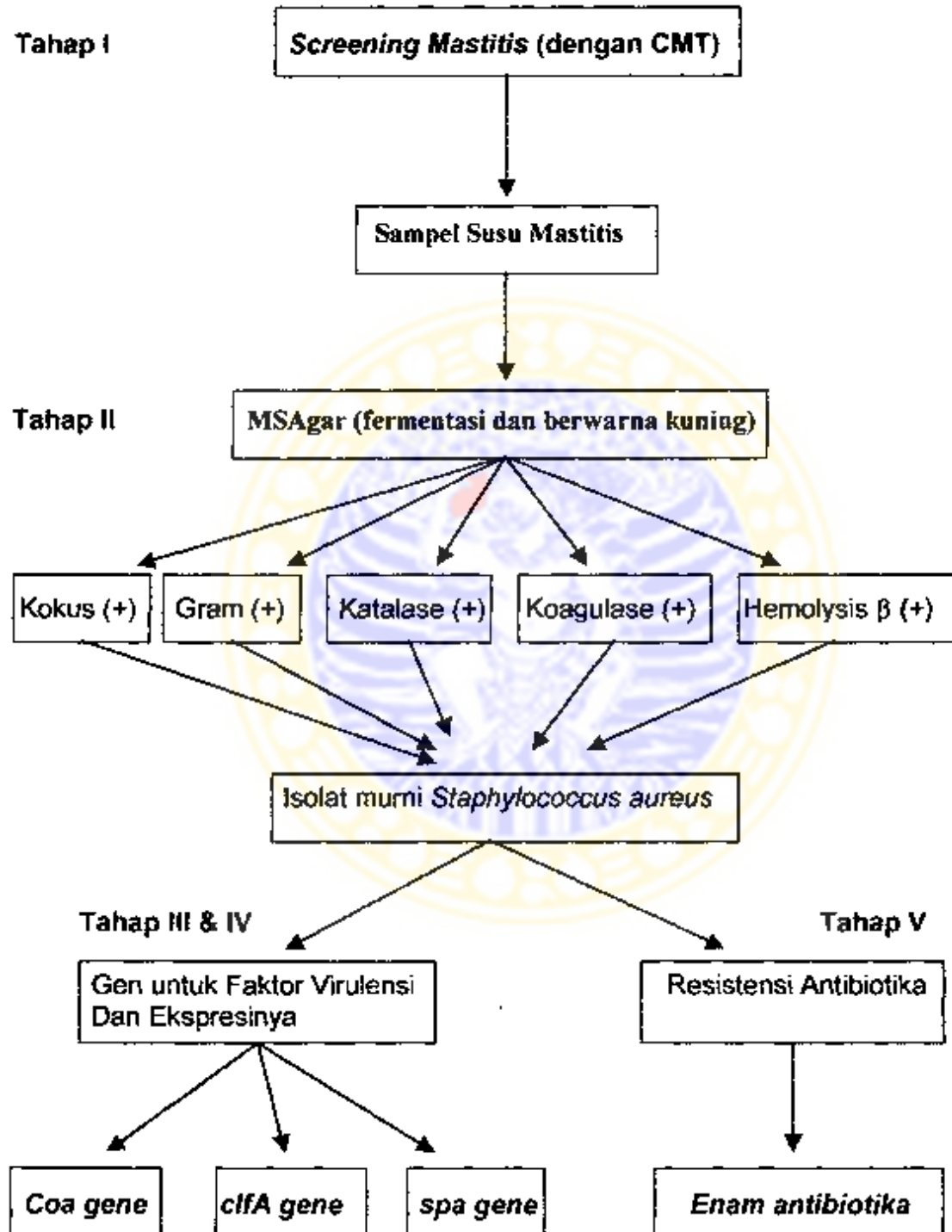
Penelitian ini dilakukan di lokasi peternakan sapi perah tempat pengambilan sampel untuk deteksi mastitis dengan uji CMT, di laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH Unair untuk uji identifikasi *Staphylococcus aureus* dan menggunakan fasilitas yang ada di *Institute of Dairy Science – University of Giessen, Germany* untuk uji identifikasi gen penyandi

protein permukaan bakteri, serta di Tropical Disease Center - Unair untuk melakukan uji ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dan pola resistensi terhadap antibiotika..



4.8 Kerangka Operasional Penelitian

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN

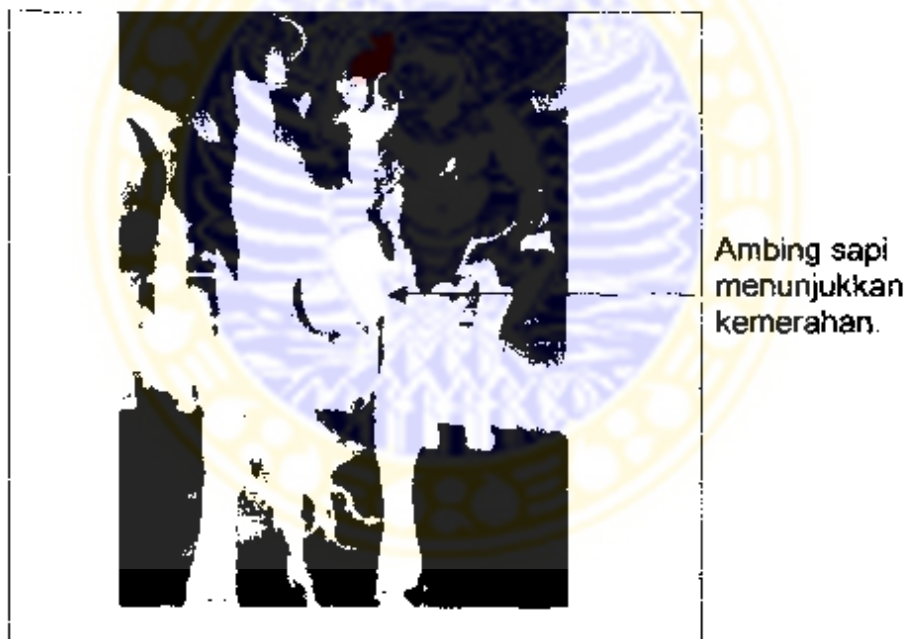
Penelitian ini berupa survey observasional dengan tujuan untuk mengetahui prevalensi mastitis di peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan pengambilan sampel susu dari peternakan sapi perah Surabaya, peternakan sapi perah Grati, peternakan sapi perah Batu dan peternakan sapi perah Nongkojajar. Selanjutnya dari sampei susu mastitis tersebut diisolasi isolat *Staphylococcus aureus* dengan maksud untuk diteliti variabilitas gen penyandi faktor virulensi dari *Staphylococcus aureus* yang terkait dengan protein permukaan bakteri dan juga diteliti pula tentang pola resistensi terhadap antibiotika. Hasil penelitian akan dijelaskan berupa data dan analisis yang sesuai dengan tujuan dan hipotesisnya, dan penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, Gambar, foto atau gambar yang sesuai rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari 5 tahap penelitian, yaitu :

1. Prevalensi mastitis pada sapi perah di Jawa Timur dengan alat screening *California Mastitis Test* (CMT).
2. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kriteria laboratorium yaitu mikroskopis berbentuk kokus bergerombol, Gram +, katalase +, koagulase +, hemolisis β dan fermentasi manitol.
3. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan pendekatan genotipik gen penyandi protein permukaan bakteri.

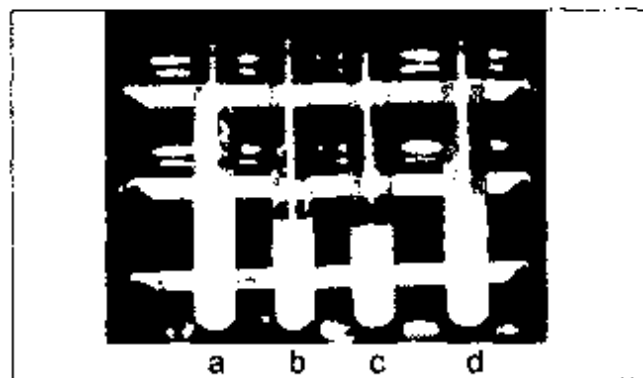
4. Karakterisasi *Staphylococcus aureus* melalui hasil ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri.
5. Karakterisasi *Staphylococcus aureus* melalui metode *disk diffusion* untuk uji sensitivitas antibiotika.

5.1. Prevalensi Mastitis Sapi Perah

Berdasarkan pada visualisasi dan palpasi ambing sapi perah 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 Sapi penderita mastitis klinis dari peternakan Batu



Gambar 5.2 Susu yang diambil dari sapi penderita mastitis klinis dan subklinis

- Sampel susu mastitis klinis dengan gejala susu pecah
- Sampel susu mastitis klinis dengan gejala susu terdapat gumpalan kuning
- Sampel susu mastitis klinis dengan gejala susu bemanah
- Sampel susu mastitis subklinis tidak nampak perubahan

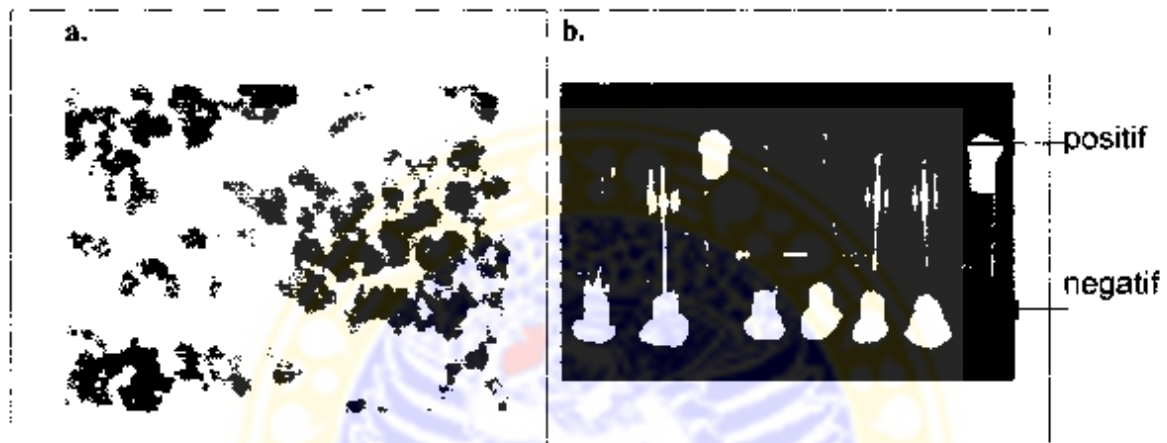
Tabel 5.1 Prevalensi Mastitis pada Sapi Perah di Empat Lokasi Peternakan Sapi Perah

Peternakan sapi perah	Sampel sapi	Mastitis klinis (%)	Mastitis subklinis (%)	Normal (%)	Total mastitis (%)
Surabaya	22	0	19 (86,4%)	3 (13,6%)	19 (86,4%)
Grati	117	0	93 (79,5%)	24 (20,5%)	93 (79,5%)
Batu	71	3 (4,2%)	56 (78,9%)	12 (16,9%)	59 (83,1%)
Nongkojajar	98	5 (5,1%)	76 (77,6%)	17 (17,3%)	81(82,7%)

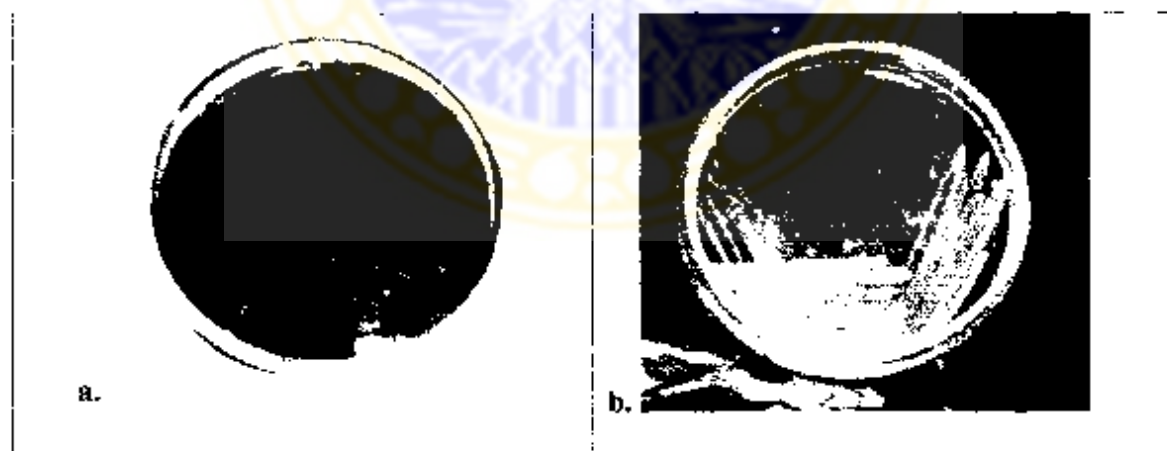
Diskripsi dari tabel di atas didapatkan data prevalensi mastitis dari masing-masing peternakan sapi perah yaitu : peternakan sapi perah Nongkojajar dengan angka prevalensi 82,7%, peternakan sapi perah Batu dengan angka prevalensi 83,1%, peternakan sapi perah Surabaya dengan angka prevalensi 86,4% dan peternakan sapi perah Grati dengan angka prevalensi 79,5%.

5.2 Identifikasi Isolat *Staphylococcus aureus*

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



Gambar 5.3 a. Mikroskopis kokus dengan pewarnaan Gram positif
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).

Tabel 5.2 Isolat *Staphylococcus aureus*

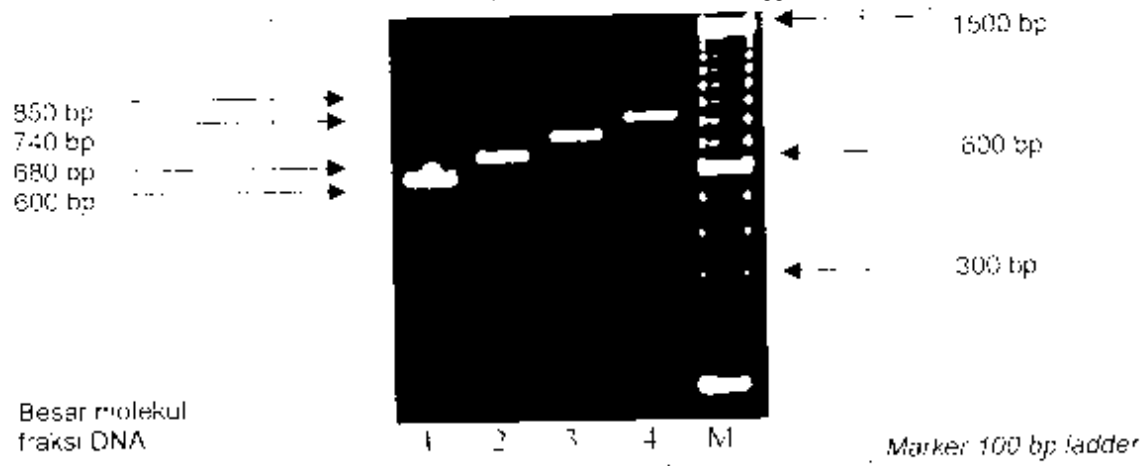
Lokasi Peternakan sapi perah	Isolat Bakteri	<i>Staphylococcus aureus</i>
Surabaya	19	5 (26,3%)
Grati	93	12 (12,9%)
Batu	59	6 (10,17%)
Nongkojajar	81	8 (9,9%)

5.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan pendekatan genotipik gen penyandi protein permukaan bakteri.

Tabel 5.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan pendekatan genotipik gen penyandi protein permukaan bakteri.

	<i>Coa gene (bp)</i>				<i>CifA gene (bp)</i>		<i>Spa gene (bp)</i>	
	600	680	740	850	950	1000	110	220
Surabaya	1	0	0	3	0	4	2	2
Grati	1	1	1	2	2	3	1	4
Batu	1	0	1	3	0	5	1	4
Nongkojajar	2	0	1	2	1	4	2	3

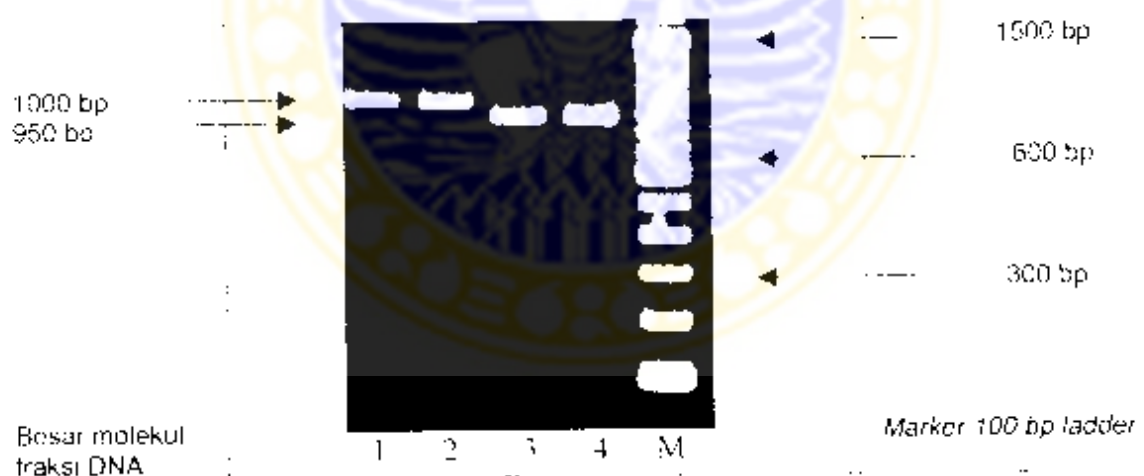
Urutan *oligonucleotida primers* yang digunakan untuk mengamplifikasi gen penyandi *staphylococcal coagulase* adalah Coa 1: ATA GAG ATG CTG GTA CAG G dan Coa 2: GCT TCC GAT TGT TCG ATG C dengan program *thermocycler* 30 kali (94°C , 1 menit, 58°C , 1 menit dan 72°C, 1 menit) (Akineden *et al.*, 2001). Hasilnya seperti gambar 5.5.



Gambar 5.5 Gen penyandi koagulase

Lajur 1 Besar molekul 600 bp, lajur 2 Besar molekul 680 bp, lajur 3 Besar molekul 740 bp, lajur 4 Besar molekul 850 bp dan lajur M adalah penanda 100 bp

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi *clumping factor* adalah C1fA-1 : GGC TTC AGT GCT TGT AGG dan C1fA-2 : TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC dengan program *thermocycler* 35 kali (94°C ,1 menit, 57°C , 1 menit dan 72°C. 1 menit) (Akineden *et al.* , 2001). Hasilnya seperti gambar 5.6



Gambar 5.6 Gen penyandi *clumping factor*

Lajur 1 Besar molekul 1000 bp, lajur 2 Besar molekul 1000 bp, lajur 3 Besar molekul 950 bp, lajur 4 Besar molekul 950 bp dan lajur M adalah penanda 100 bp

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). Hasilnya seperti gambar 5 7.

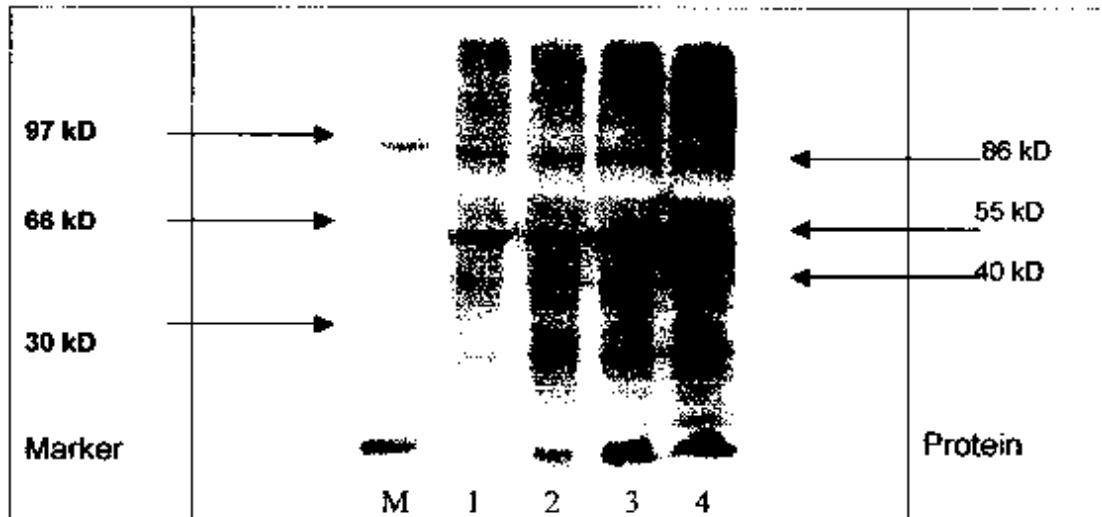


Gambar 5.7 Gen penyandi protein A
Lajur 1 Besar molekul 110 bp, lajur 2 Besar molekul 110 bp, lajur 3 Besar molekul 220 bp, lajur 4 Besar molekul 220 bp dan lajur M adalah penanda 100 bp

5.4 Karakterisasi *Staphylococcus aureus* melalui ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri.

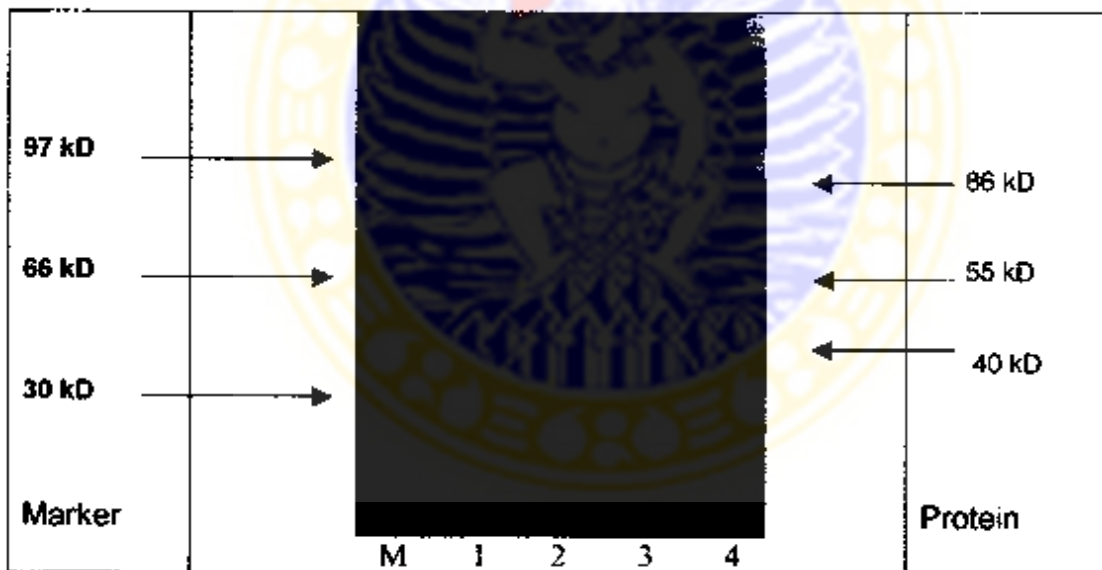
Hasil elektroforesis protein dengan menggunakan SDS-PAGE menggambarkan bahwa isolat *Staphylococcus aureus* dari ke empat peternakan sapi perah di Jawa Timur mempunyai pola band yang tervisualisasi hampir sama bentuknya. Meskipun dalam inkubasinya menggunakan suhu inkubasi yang berbeda yaitu dengan suhu 37°C dan 42°C.

Gambar 5.8 dan 5.9 menunjukkan pola band pada protein permukaan *Staphylococcus aureus* dengan inkubasi 37°C dan 42°C.



Gambar 5.8 Ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dengan inkubasi 37^o C.

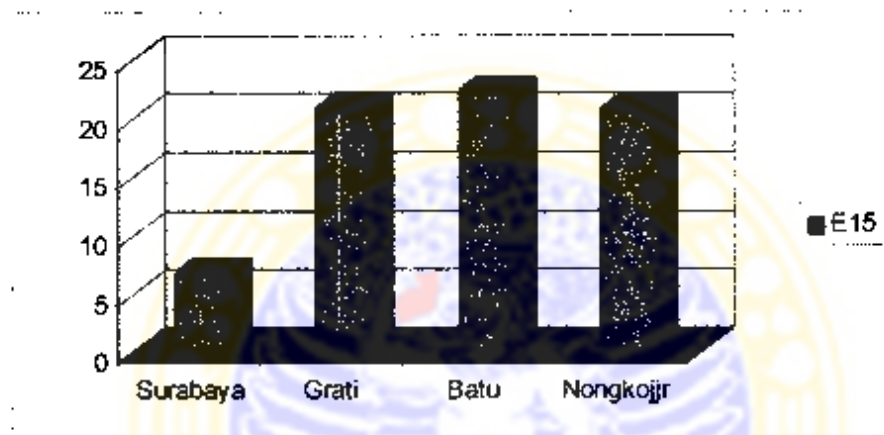
Lajur M adalah penanda protein 14- 200 kD, lajur 1 isolat Surabaya, lajur 2 isolat Grati, lajur 3 isolat Batu, lajur 4 isolat Nongkojajar



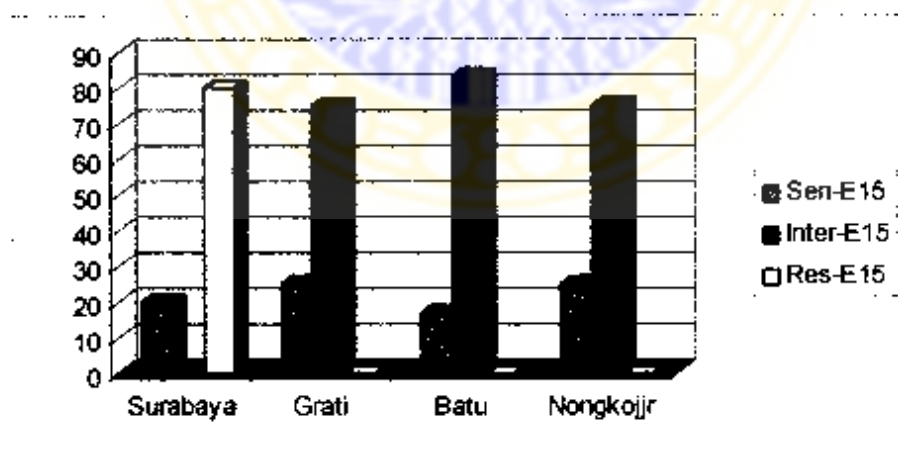
Gambar 5.9 Ekspresi gen penyandi protein permukaan bakteri dengan inkubasi 42^o C

Lajur M adalah penanda protein 14-200 kD, lajur 1 isolat Surabaya, lajur 2 isolat Grati, lajur 3 isolat Batu, lajur 4 isolat Nongkojajar

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika eritromisin pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 6,79 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 20,95 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 22,37 dan peternakan sapi perah Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 20,73 mm, tetapi tidak ada perbedaan secara signifikan antara peternakan Surabaya dibandingkan ke tiga peternakan lainnya dengan uji Kruskal Wallis.

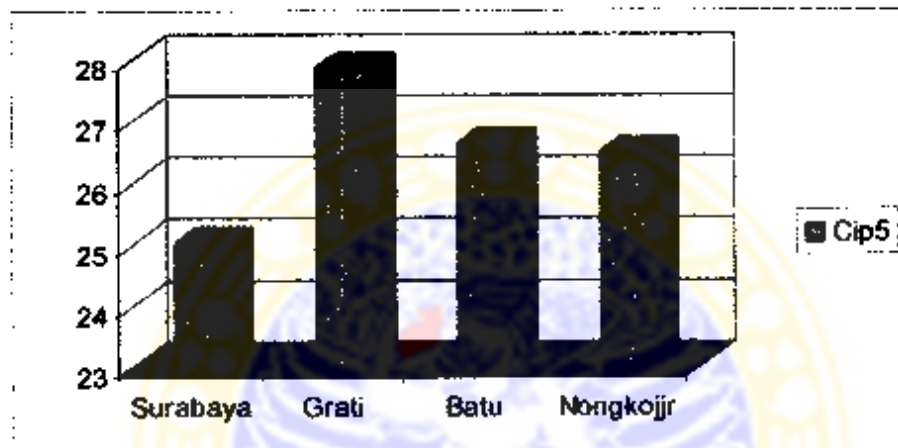


Gambar 5.11 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika eritromisin.

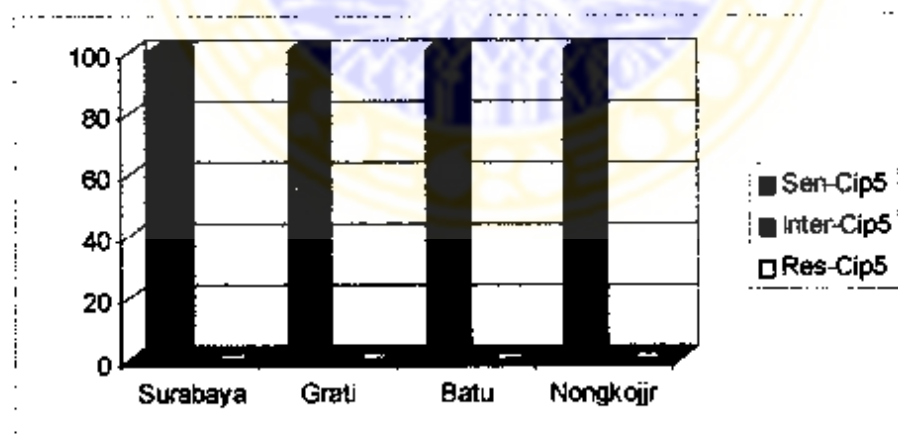


Gambar 5.12 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), *intermediate* (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika eritromisin.

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika *ciproxin* pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 25,03 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 27,85 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 26,62 dan peternakan sapi perah Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 26,47 mm yang berarti tidak ada perbedaan secara signifikan antar ke empat peternakan tersebut.

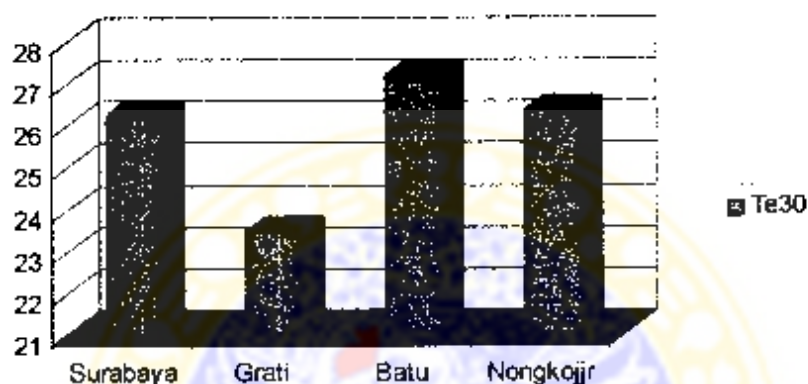


Gambar 5.13 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika *ciproxin*.

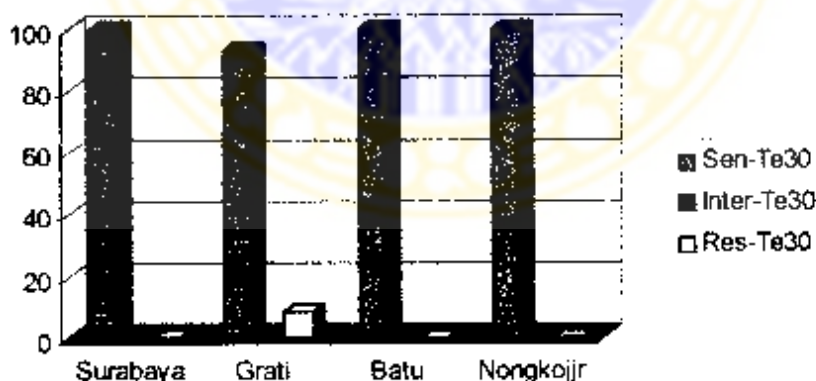


Gambar 5.14 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), *intermediate* (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika *ciproxin*.

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika tetrasiklin pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 26,24 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 23,50 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 27,18 dan peternakan sapi perah Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 26,37 mm yang berarti tidak ada perbedaan secara signifikan antar ke empat peternakan tersebut.

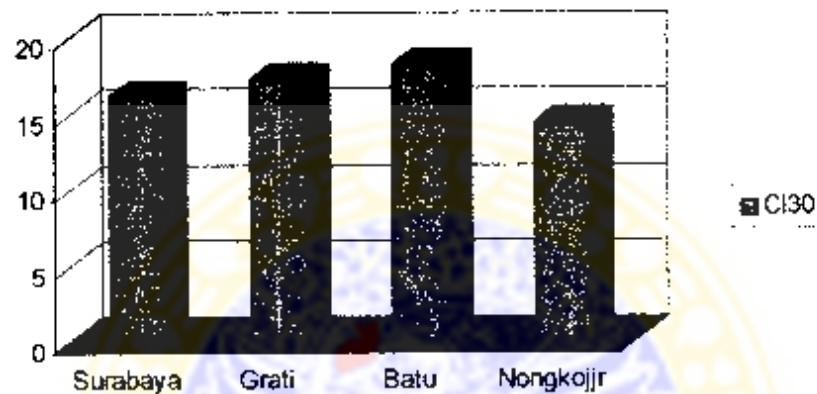


Gambar 5.15 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika tetrasiklin.

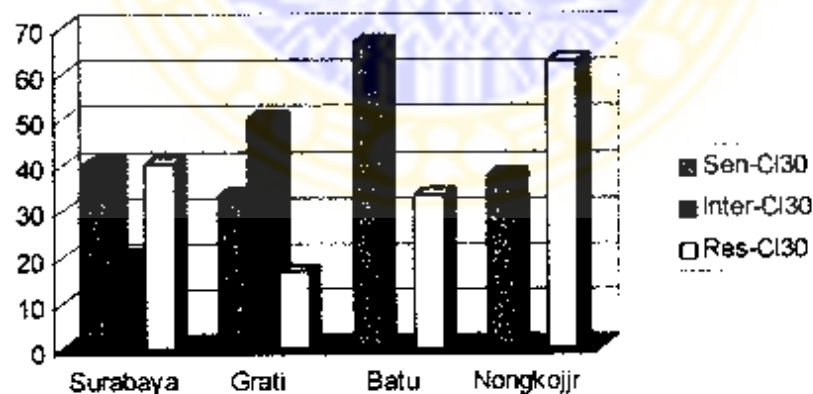


Gambar 5.16 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), intermediate (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika tetrasiklin.

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika *cephalexin* pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 16,21 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 17,31 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 18,21 dan peternakan sapi perah Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 14,44 mm yang berarti tidak ada perbedaan secara signifikan antar ke empat peternakan tersebut.

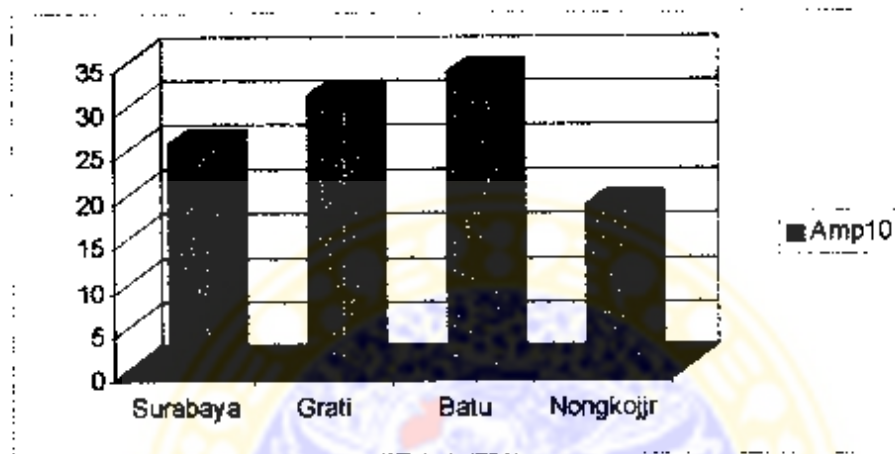


Gambar 5.17 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika *cephalexin*.

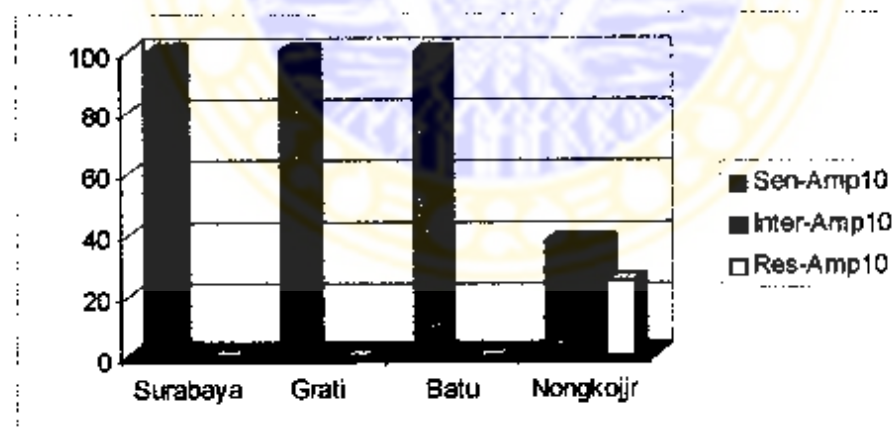


Gambar 5.18 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), intermediate (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika *cephalexin*.

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika ampisilin pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 25,71 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 31,07 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 33,73 dan peternakan sapi perah Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 18,71 mm yang berarti ada perbedaan secara signifikan antara peternakan sapi perah Nongkojajar dibandingkan ke tiga peternakan lainnya.

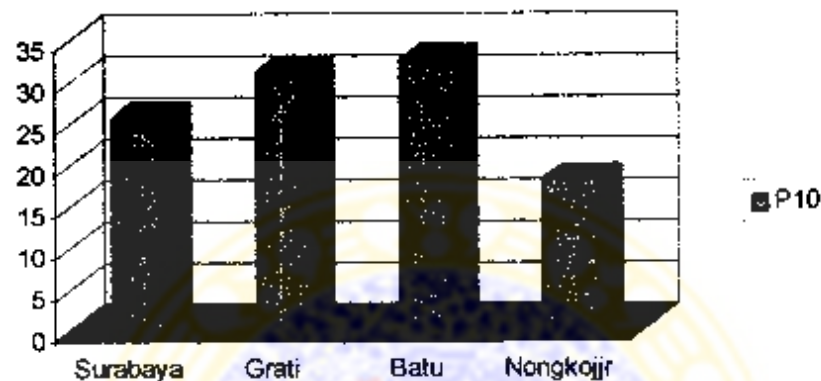


Gambar 5.19 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika ampisilin.

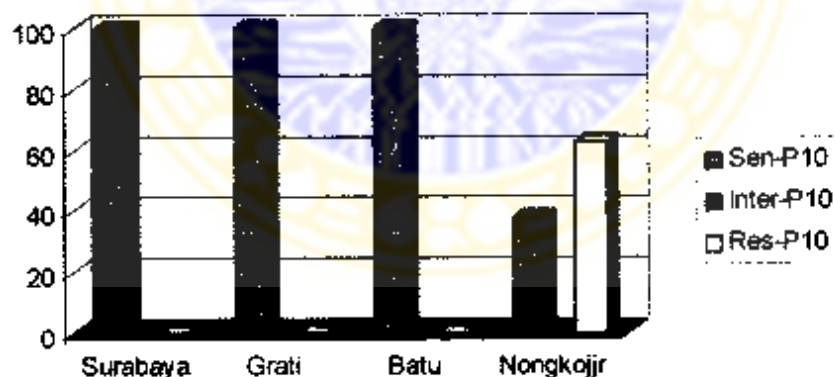


Gambar 5.20 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), *intermediate* (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika ampisilin.

Hasil analisis statistik uji resistensi antibiotika penisilin pada *Staphylococcus aureus* dari peternakan sapi perah Surabaya menunjukkan nilai rata-rata pada 25,56 mm, peternakan sapi perah Grati menunjukkan nilai rata-rata 31,00 mm, peternakan sapi perah Batu menunjukkan nilai rata-rata 32,46 dan peternakan Nongkojajar menunjukkan nilai rata-rata 18,07 mm yang berarti ada perbedaan secara signifikan antara Peternakan sapi perah Nongkojajar dibandingkan ke tiga peternakan lainnya.



Gambar 5.21 Histogram rata-rata diameter zona hambat (mm) pada 4 lokasi peternakan sapi perah dengan cakram antibiotika penisilin.



Gambar 5.22 Histogram perbandingan persentase antara sensitif (Sen), intermediate (Inter) dan resisten (Res) pada 4 lokasi peternakan sapi perah di Jawa Timur dengan cakram antibiotika penisilin.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Prevalensi Mastitis Sapi Perah

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari data prevalensi mastitis dari masing-masing peternakan sapi perah adalah : peternakan sapi perah Surabaya dengan angka prevalensi 86,4% dan peternakan sapi perah Grati dengan angka prevalensi 79,5%, peternakan sapi perah Batu dengan angka prevalensi 83,1%, peternakan sapi perah Nongkojajar dengan angka prevalensi 82,7%.

Penentuan diagnostik penyakit mastitis berdasarkan pada angka *Somatic Cells Count* (SCC) yang secara langsung tervisualisasikan dengan hasil pada uji *California Mastitis Test* (CMT) (Jones, 1998). Sel somatik dalam susu terdiri dari makrofag, limfosit, neutrofil dan sel epitel kelenjar susu. Jumlah SCC dalam susu merupakan indikator untuk kesehatan kelenjar susu (Pfaffl *et al.*, 2003). Peningkatan jumlah SCC dalam susu sebagai respon adanya invasi mikroorganisme yang berarti terjadinya peningkatan aktivitas imunologi dalam kelenjar susu (Pfaffl *et al.*, 2003)

Tingginya angka prevalensi mastitis ini disebabkan oleh sangat jeleknya sistem pembuangan kotoran peternakan sapi perah di daerah penelitian. Sanitasi yang jelek merupakan salah satu sumber penularan penting untuk kasus mastitis. Merujuk Smith and Hogan (1999) mengatakan bahwa sumber

penyakit penting untuk mastitis lingkungan adalah lingkungan sapi perah. Faktor lingkungan mengkontaminasi ujung puting yang merupakan jalan utama dari bakteri patogen yang mencemari lingkungan untuk menimbulkan mastitis.

Tingginya angka prevalensi mastitis ini didukung oleh penelitian Zdanowicz (2002) yang mengindikasikan bahwa sapi perah menghabiskan waktunya sekitar 50 – 60% dengan tiduran di lantai dan bakteri dapat dipindahkan antara permukaan kandang dengan puting susu. Usaha untuk meminimalkan paparan puting susu ke mikroorganisme patogen adalah hal penting untuk dimengerti terutama lantai kandang atau alas tidur sapi yang berperan untuk terjadinya proliferasi bakteri. Tersedianya nutrisi, adanya kelembaban, pH yang cocok merupakan faktor utama tumbuhnya bakteri pada alas tidur sapi. Jumlah bakteri dalam alas tidur dari bahan anorganik menunjukkan jumlah yang lebih rendah dibandingkan dari bahan organik (Bewley *et al.*, 2001). Hogan and Smith (1997) melaporkan hasil temuannya bahwa jumlah bakteri *coliform* dan *Klibsiella spp* lebih tinggi pada alas tidur dari jerami dibandingkan dengan alas tidur dari pasir dan pembiakan bakterinya juga dilakukan pada ujung puting sapi perah yang menempel pada alas tidurnya. Alas tidur dari bahan anorganik yaitu kapur lebih menekan proliferasi bakteri dibandingkan dengan pasir, hal ini disebabkan karena kapur merupakan bahan alkalin dan pHnya tinggi yang tidak cocok untuk pertumbuhan bakteri (Zdanowicz, 2002).

Sumber patogen dari lingkungan termasuk kotoran sapi, tempat pakan dan minum sapi serta material untuk alas tidur sapi. Alas tidur sapi merupakan

sumber patogen lingkungan dalam peternakan sapi perah yang memacu terjadinya mastitis jika ujung puting sapi sering dan lama kontak dengannya.

Bakteri *Streptococci* dan *coliform* yang merupakan patogen lingkungan dapat hidup dan berkembang pada alas tidur dari bahan organik. Jerami yang digunakan sebagai alas 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 pengendalian mastitis yang disebabkan oleh patogen lingkungan adalah penggunaan alas dari bahan inorganik seperti pasir atau tumbukan batu kapur yang terbukti menghambat pertumbuhan patogen lingkungan.

Faktor lain untuk tingginya angka prevalensi 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 menginfeksi 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 pembersihan 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 sapi dara menyusui dari induk yang terinfeksi patogen (Waage *et al.*, 2001).

Untuk lebih mengenal mastitis yang disebabkan oleh agen penyakit *Staphylococcus aureus*, perlu dikaji lebih mendalam mengenai epidemiologi dari agen penyakit tersebut. Epidemiologi *Staphylococcus aureus* harus terkait dalam faktor sumber penyakit, sistem penularan dan faktor resiko penyakit (Roberson, 1999). Pengendalian *Staphylococcal mastitis* ditekankan pada pengertian bahwa penularan penyakit ini utamanya terjadi dalam proses pemerahan. Higiene dalam proses pemerahan akan menurunkan angka penularan antar sapi perah yang juga menurunkan adanya kasus mastitis baru yang disebabkan *Staphylococcus aureus*. Pengendalian kasus ini lebih difokuskan pada pengobatan masa kering laktasi dan pengafkiran sapi yang terinfeksi (Roberson, 1999).

Tidak ada keraguan sedikitpun bahwa sumber penyakit utama dari *Staphylococcal mastitis* adalah kelenjar susu yang terinfeksi. Dalam penelitian Davidson (1961) yang oleh Roberson (1999) dinyatakan bahwa *Staphylococcus aureus* dapat diisolasi dari seluruh bagian tubuh sapi dan disimpulkan yang menjadi sumber penyakit utama dari kasus *Intramammary Infections* (IMI) adalah kelenjar susu yang terinfeksi. Roberson, *et al.*, (1994) menerangkan beberapa strain dari *Staphylococcus aureus* tereliminasi dari luar bagian ambing sapi perah pada waktu pengobatan ambing sapi, hal ini

mengindikasikan bahwa ambing merupakan sumber penyakit utama bagi sapi perah. Penularan paling utama terjadi dari kelenjar susu yang terinfeksi ke kelenjar susu yang belum terinfeksi melalui beberapa alat antara lain; peralatan pemerahan atau tangan pemerah susu.

Mastitis terjadi jika sapi perah dengan kasus IMI oleh *Staphylococcus aureus* selesai diperah, maka jika pemerahan mulai pada sapi perah baru maka paparan *Staphylococcus aureus* akan menyerang sapi perah yang baru diperah tersebut. Pentingnya penyebaran melalui tangan pemerah hampir sama pentingnya dalam penyebaran mastitis ini dan sebanding dengan penyebaran dengan menggunakan handuk pembersih ambing. Untuk mengurangi bahaya penyebarannya perlu dilakukan dengan menggunakan sarung tangan plastik (*glove*) yang didesinfeksi. Peralatan yang berpotensi sebagai alat penularan lainnya adalah *strip cup*.

Pengendalian *Staphylococcal mastitis* dengan metode kontrol terhadap lalat dapat mengurangi penularan *Staphylococcus aureus* ke prepartum sapi dara oleh Roberson (1999) yang mengamati lalat yang hinggap pada puting sapi dara pada waktu merumput merupakan vektor yang bertanggungjawab pada penyebaran *Staphylococcus aureus*. Owens *et al.*, (1998) melaporkan bahwa lalat mampu menularkan *Staphylococcus aureus* dan menyebabkan IMI pada sapi dara. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa lalat dapat menyebarkan *Staphylococcus aureus* sehingga pengendalian lalat mungkin juga merupakan prosedur kontrol yang cukup penting dalam peternakan sapi

perah yang khususnya dengan angka prevalensi *Staphylococcus aureus* sedang ke tinggi (Roberson, 1999).

Uraian di atas dapat dijadikan bahan kajian untuk mengendalikan mastitis dengan memperhatikan berbagai faktor lingkungan terutama bahan alas tidur sapi perah yang dapat dijadikan sebagai sumber penyakit penunjang hidup dari agen penyebab mastitis. Pada kasus mastitis lingkungan serta untuk mastitis kontagiosa lebih ditekankan pada sanitasi pemerahan dan pengendalian lalat vektor penyebar agen penyebab mastitis.

6.2 Identifikasi Isolat *Staphylococcus aureus*

Identifikasi *Staphylococcus aureus* bertujuan untuk memperoleh isolat murni *Staphylococcus aureus* dari kasus mastitis sapi perah di Jawa Timur. Dalam identifikasi ini digunakan metode standar yaitu berupa uji mikroskopis, pengecatan Gram, uji fermentasi pada *Manitol Salt Agar*, uji katalase, uji hemolisis dan uji koagulase yang berguna untuk membedakan dengan berbagai spesies *Staphylococcus* yang menginfeksi kelenjar susu sapi perah.

Pemeriksaan identifikasi sampel susu mastitis sebanyak 252 sampel. Infeksi *Staphylococcus aureus* yang terjadi sering dengan manifestasi subklinis, maka upaya dari penelitian ini adalah untuk mengamati dan menilai keberadaan *Staphylococcus aureus* melalui pendekatan metode standar laboratorium. Organisme yang diisolasi dari sampel susu yang ditumbuhkan ke MS agar yang mengandung 7,5% *sodium chloride* akan membatasi pertumbuhan organisme lainnya, tetapi genus *Staphylococcus* dapat tumbuh. Setelah dilakukan

identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan metode standar laboratorum diperoleh isolat *Staphylococcus aureus* berjumlah 31 isolat. Sisanya positif spesies *Staphylococcus* yang lain dalam jumlah yang menyebar antara lain *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus* dan sebagian merupakan genus dari *Streptococcus spp* yang ditandai dengan uji katalase negatif dan berbentuk mikroskopis rantai kokus.

Sebuah identifikasi yang cepat dan terpercaya untuk *Staphylococcus 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 standar dalam identifikasi *Staphylococcus aureus* dalam susu. Hanya separuh dari isolat *Staphylococcus 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). Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Chusniati dan Effendi (2003) yang membandingkan antara uji koagulase tabung dan uji koagulase *slide test* yang menghasilkan kesimpulan bahwa sensitivitas koagulase *slide test* untuk deteksi mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* cukup tinggi yaitu 91,11% dan dapat dipakai untuk mengkonfirmasi tentang agen penyebab mastitis *Staphylococcus aureus* dengan cepat.

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 *Staphylococcus aureus* tidak

menunjukkan aktivitas β hemolisis pada kultur primernya. Jadi uji β hemolisis merupakan uji yang spesifik tetapi kurang sensitif untuk identifikasi *Staphylococcus aureus*. Untuk menghasikan identifikasi *Staphylococcus aureus* yang cepat dan terpercaya perlu mengkombinasikan antara uji β hemolisis dengan uji koagulase dengan waktu inkubasi 4 jam (Boerlin *et al.*, 2003).

Rendahnya hasil isolasi *Staphylococcus aureus* ini mungkin disebabkan kemampuan tumbuh dan berkembangnya bakteri tersebut tergantung dari kemampuan untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. *Staphylococcus aureus* mempunyai beberapa mekanisme untuk mengatasi perubahan terutama dalam sebuah infeksi (Haris *et al.*, 2003). Pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus* pada kondisi ideal terdiri dari tiga fase yaitu fase lag, eksponensial dan stasioner. Pada kondisi yang tidak menguntungkan maka bakteri mengalami penghentian pertumbuhan.

6.3 Identifikasi Molekuler Gen Penyandi Permukaan Protein Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pemeriksaan ini bertujuan untuk menemukan adanya faktor virulensi *Staphylococcus aureus* yang diambil dari kasus mastitis pada sapi perah. Faktor virulensi yang diperiksa merupakan gen penyandi protein permukaan bakteri yang berfungsi utama untuk perlekatan pada sel hospes dalam proses infeksi awal terjadinya mastitis, yang terdiri dari gen penyandi koagulase, gen penyandi protein A dan gen penyandi *clumping factor*.

Pemeriksaan faktor virulensi *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan mastitis pada sapi perah di Jawa Timur bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Polimorfisme adalah perbedaan bentuk dari struktur dasar untuk mencari variabilitas *Staphylococcus aureus* secara epidemiologi molekuler. Polimorfisme DNA banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik *Staphylococcus aureus* dan untuk mengetahui faktor virulensinya digunakan gen penyandi koagulase, gen penyandi protein A dan gen penyandi *clumping factor*.

Teknik analisis polimorfisme DNA dengan menggunakan PCR mempunyai beberapa kelebihan antara membutuhkan sampel DNA sedikit dan tidak membutuhkan radioisotop, selain itu analisis polimorfisme DNA tidak membutuhkan sekuen DNA lebih dulu dan prosedurnya lebih sederhana (Kuzma *et al.*, 2005)

Staphylococcus aureus yang menginfeksi kelenjar susu sapi perah mempunyai keragaman genetik yang berbeda pada setiap strain (Zadoks, 2002). Pengetahuan tentang variabilitas genetik dapat digunakan sebagai pijakan dalam upaya pengendalian mastitis secara akurat.

Penelitian Raimundo *et al.*, (1999) memperlihatkan bahwa pelacakan sistem subtipe berdasarkan pada ukuran dan pola restriksi dari produk PCR dengan merujuk pada gen penyandi koagulase dapat melakukan penyelidikan hubungan epidemiologi antara isolat *Staphylococcus aureus* dari kasus bovine mastitis. Hasil dari penelitian tersebut menggambarkan bahwa secara teknis

sangat sederhana dengan reproduktivitas yang tinggi dan kemampuan yang baik untuk membedakan variabilitas genetik antar *Staphylococcus aureus*.

Sembilan belas isolat yang diteliti dapat didefinisikan terdiri dari 4 tipe dengan besar molekul 600 bp, 680 bp, 740 bp dan 850 bp. Hasil ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Vieira-da-Motta *et al.*, (2001) yang menghasilkan gambaran polimorfisme gen penyandi koagulase ada 4 tipe. Tipe dengan besar molekul 850 bp yang merupakan tipe paling umum sebagai penyebab *Staphylococcal mastitis* di peternakan sapi perah. Hasil penelitian tersebut didukung oleh beberapa penelitian yang dilakukan oleh Raimundo *et al.*, (1999) dan Salasia *et al.*, 2004 yang menyatakan bahwa gen penyandi koagulase yang terbanyak di daerah penelitiannya mempunyai besar molekul 850 bp. Perbedaan biologis antar strain berdasarkan gen penyandi koagulase masih belum jelas, tetapi dapat dimengerti bahwa gen penyandi koagulase mempunyai kekuatan pembeda antar strain *Staphylococcus aureus* yang nantinya berguna untuk studi epidemiologis di masa mendatang.

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa gen penyandi protein A juga merupakan pilihan yang baik untuk mengidentifikasi serta membedakan variabilitas strain *Staphylococcus aureus* (Kuzma *et al.*, 2005). Amplifikasi dari gen penyandi protein A menghasilkan 2 tipe gen penyandi dengan besar molekul 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 besar molekul 110 bp dan 220 bp merupakan gen penyandi protein A dari *X region*.

Merujuk pendapat Shopsin *et al.*, (1999) yang menyatakan bahwa penggunaan gen penyandi protein A untuk identifikasi dan pembedaan strain *Staphylococcus aureus* adalah mudah dibandingkan dengan tehnik molekuler lainnya. Dalam penelitian tersebut gen penyandi protein A secara akurat dapat mengidentifikasi dan membedakan lima *clones* utama dari 261 strain koleksi MRSA di rumah sakit New York City yang berasal dari analisis kombinasi PFGE dan RFLP. Penggunaan tehnik molekuler dengan gen penyandi protein A menggambarkan beberapa keuntungan antara lain kecepatan analisis, kemudahan penggunaan, kemudahan interpretasi, standardisasi dan kemudahan penyebaran teknologi (Kuzma *et al.*, 2005). Meskipun tidak satu tehnik molekuler yang lebih baik dibanding dengan tehnik molekuler lainnya dalam penyelesaian semua kasus (Tenover *et al.*, 1994), tetapi tampaknya penggunaan gen penyandi protein A dapat membedakan secara epidemiologi molekuler adanya hubungan strain dengan cepat dan mudah (Shopsin *et al.*, 1999). Hal ini menyebabkan penggunaan tehnik ini sangat berguna untuk permulaan *screening* yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan studi epidemiologi agen penyakit *Staphylococcus aureus* secara langsung.

Amplifikasi dari gen penyandi *clumping factor* menghasilkan 2 tipe gen penyandi dengan besar molekul 950 bp dan 1000 bp. Hasil amplifikasi ini

merupakan polimorfisme gen penyandi *clumping factor* yang merujuk penelitian Akineden *et al.* (2001) terdiri dari 950 bp dan 1000 bp, tetapi Salasia *et al.* (2004) menerangkan bahwa gen penyandi *clumping factor* mengindikasikan tidak ada polimorfisme dengan besar molekul sekitar 1000 bp.

Meskipun adanya polimorfisme dengan penggunaan gen penyandi *clumping factor*, tetapi dengan hasil yang seperti tabel 5.3 maka tidak dianjurkan menggunakan gen penyandi *clumping factor* untuk studi epidemiologi molekuler sebagaimana yang didapatkan oleh Salasia *et al.*, (2004).

Penggunaan polimorfisme dari gen penyandi protein permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* tersebut merupakan salah satu teknik molekuler untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies dan sub spesies dengan cepat (Zadoks, 2002). Hasil identifikasi molekuler tersebut dapat disimpulkan adanya beberapa strain *Staphylococcus aureus* yang berhasil diisolasi dari kasus mastitis pada sapi perah di Jawa Timur.

6.4 Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Permukaan Bakteri

Pada penelitian ini, dapat dikarakterisasi beberapa protein yang terkait dengan protein permukaan bakteri yang berperan dalam faktor virulensi *Staphylococcus aureus*. Protein tersebut adalah protein dengan berat molekul 40 kD, 55 kD dan 86 kD. Protein dengan berat molekul (BM) 40 kD berupa protein *clumping factor*, protein dengan BM 55 kD berupa protein A (*spa*), dan protein dengan BM 86 kD berupa protein koagulase (gambar 5.8).

Protein *clumping factor* dengan BM 40 kD merupakan protein yang diekspresikan pada fase pertumbuhan stasioner yang berasosiasi dengan permukaan sel bakteri. Protein ini mengikat protein hospes yang berupa *fibronectin*, *fibrinogen*, *collagen* dan *vitronectin*. Protein *clumping factor* bertanggung jawab untuk interaksi antara Fg dengan *Staphylococcus aureus* (Shannon, 2005). Ketika protein *clumping factor* mengikat plasma maka terbentuk sebuah kompleks Fg yang merupakan fenomena yang terkait dengan sifat patogenik dari *Staphylococcus aureus* (McDevitt *et al.*, 1994). Fg merupakan protein yang dikonversi oleh thrombin ke bentuk fibrin yang esensial dari pembekuan darah. Protein *clumping factor* diekspresikan *in vitro* pada semua tahap pertumbuhan bakteri (McDevitt *et al.*, 1992) dan protein ini dapat digunakan sebagai proteksi dalam hewan coba yang sepsis dan model kelinci dalam kasus endokarditis (Hall *et al.*, 2003). Menurut Wolz *et al.*, (2002) menyatakan bahwa untuk meningkatkan perlekatan antara bakteri dan sel hospes, maka *Staphylococcus aureus* mengeluarkan beberapa adhesin yang spesifik yang terletak pada permukaan bakteri yang disebut *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Perlekatan spesifik *Staphylococcus aureus* ke fibrinogen utamanya dimediasi oleh *clumping factor*. Protein *clumping factor* mempunyai tanggung jawab untuk mediasi perlekatan *Staphylococcus aureus* ke *matrix proteins* yang merupakan sebuah langkah penting dalam proses infeksi (Patti, 1994).

Fibrinogen diidentifikasi sebagai bahan utama yang terkait dengan protein plasma (McDevitt *et al.*, 1994). *fibrinogen* diubah oleh thrombin ke

bentuk fibrin yang merupakan bahan untuk pembekuan darah. Masing-masing fibrinogen monomer terdiri dari tiga rantai polipeptida (α , β dan γ). Tempat pengikatan *clumping factor* dari *Staphylococcus aureus* adalah di C terminus dari rantai γ (Ni Eidhin *et al.*, 1998; McDevitt *et al.*, 1994; Deivanayagam *et al.*, 2002).

Dalam penelitian Wolz *et al.*, (2002) memperlihatkan bahwa tidak ada perbedaan dalam transkripsi *clumping factor* antara *Staphylococcus aureus* yang berasal dari berbagai sumber infeksi maupun yang berasal dari awal atau akhir suatu infeksi.

Eksresi protein A (*spa*) dengan BM 55 kD diregulasi oleh *agr* dan *sar* dan jumlahnya menurun pada fase pertumbuhan stasioner. Protein A diekspresikan oleh kebanyakan *Adhesin Staphylococci* yang termasuk famili MSCRAMMs. Hasil penelitian Effendi *et al.*, (2005) menyatakan bahwa ekspresi protein A hanya diekspresikan oleh *Staphylococcus aureus* sedangkan spesies *Staphylococci* yang patogen lainnya seperti *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus* tidak mengekspresikan protein A. Protein A 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 *Staphylococcus aureus*.

Protein *spa* mengikat Fc region dari imunoglobulin 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 fagosit dalam penyediaan tempat IgG-Fc yang mengakibatkan hilangnya kemampuan opsonisasi (Patti *et al.*, 1994). Dalam fungsi mengikat imunoglobulin, protein A tampak mengaktifkan komplemen juga merupakan faktor virulensi dari *Staphylococcus aureus* (Callegan *et al.*, 1994).

Protein koagulase dengan BM 86 kD merupakan ekstraseluler dari *Staphylococcus aureus* yang meningkatkan perlekatan *Staphylococcus aureus* dengan komponen dari hospes. Kemampuan dari protein ini untuk mengagregasi memungkinkan bentuk gerombolan pada koloni bakteri. Kemampuan perlekatan ini ditunjang oleh protein yang diekspresikan permukaan bakteri seperti *Clf*, *Fn binding protein*, *collagen binding protein*, *vitronectin binding protein*. Hal ini meningkatkan patogenitas dari *Staphylococcus aureus*. Protein koagulase diproduksi secara *in vitro* dalam fase pertumbuhan eksponensial dan terdiri dari *Fg binding (C terminus)* dan *prothrombin binding domain (N terminus)* (Kawabata *et al.*, 1986).

Untuk meningkatkan kemampuan menyebabkan mastitis, *Staphylococcus aureus* di samping mengekspresikan sejumlah protein permukaan bakteri yang berfungsi dalam perlekatan dengan sel hospes (lowy, 1998) maka *Staphylococcus aureus* mengembangkan sistem *quorum sensing* yang berfungsi untuk komunikasi antar sel bakteri dan juga regulasi untuk kolonisasi hospes dan faktor virulensi (Yarwood and Schlievert, 2003). Hal ini didukung oleh penelitian Lusastuti dan Effendi (2005) yang menyatakan ekspresi protein koagulase 86 kD dan protein A 55 kD hanya diekspresikan oleh

Staphylococcus aureus sedangkan *Staphylococcus epidermidis* tidak mengekspresikan protein tersebut.

Sistem *agr* dan *quorum sensing* menurunkan ekspresi beberapa protein permukaan bakteri dan meningkatkan sekresi beberapa faktor virulensi dalam transisi dari akhir fase pertumbuhan eksponensial ke fase stasioner secara *in vitro* (Vuong *et al.*, 2000). Sistem *agr* dan *quorum sensing* didesain untuk model patogenitas *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus dalam menginfeksi kelenjar susu dalam jumlah sedikit, bakteri mengekspresikan faktor virulensi berupa protein permukaan bakteri untuk menetralkan faktor kekebalan dari hospes. Protein A mengikat bagian Fc dari IgG dan *clumping factor* membantu membentuk gumpalan nanah di tempat infeksi (Yarwood and Schlievert, 2003), maka tempat infeksi akan kekurangan nutrisi yang disebabkan peningkatan jumlah bakteri yang mengakibatkan bakteri menyebar ke tempat jaringan hospes lainnya. Faktor virulensi lainnya adalah yang termasuk di dalamnya: faktor permukaan bakteri (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 bakteri; faktor biokimia yang dapat meningkatkan kemampuan intraseluler (carotenoids, produksi catalase); resistensi terhadap antibiotika (*β -lactamases dan penicillin binding proteins*).

Patogenesis mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* adalah multifaktorial dan sampai saat ini kurang dimengerti. Sifat patogenesis dari

Staphylococcus aureus tergantung dari dua hal penting yaitu faktor virulensi dan sifat hospes (Cunningham et al, 1996). Patogenesitas dari *Staphylococcus aureus* adalah kemampuan untuk menyebabkan penyakit dalam hospes, sedangkan faktor virulensi adalah produksi dari bakteri yang dapat menyebabkan infeksi dan meningkatkan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit (Cunningham et al, 1996).

Kemampuan *Staphylococcus aureus* untuk menempel ke plasma dan *extracellular matrix* (ECM) hospes adalah patogenesis yang signifikan dalam proses terjadinya infeksi (Haris et al, 2003). Beberapa adhesin yang spesifik yang diekspresikan pada permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* akan berinteraksi dengan protein hospes antara lain *fibronectin*, *fibrinogen*, *collagen*, *vitronectin* dan *laminin* (Foster and McDevitt, 1994), dan termasuk dalam MSCRAMMs.

Untuk dapat diklasifikasikan sebagai MSCRAMMs maka protein harus terletak pada permukaan bakteri dan harus mengenal makro molekul *ligand* yang ditemukan dalam ECM hospes (Haris et al., 2003), yang termasuk molekul *ligand* adalah *collagen* dan *laminin* yang hanya ditemukan dalam ECM dan lainnya seperti *fibronectin* dan *fibrinogen* yang ditemukan dalam ECM dan plasma darah (Patti et al., 1994). Sebuah MSCRAMM dapat mengikat beberapa *ligand* ECM dan *Staphylococcus aureus* dapat mengekspresikan beberapa MSCRAMMs yang dapat mengenal matrik molekul yang sama (McDevitt et al., 1994).

Faktor protein permukaan bakteri merupakan hal utama dari *Staphylococcus aureus* sebagai bahan mempromosi kolonisasi ke jaringan hospes, hal ini didasarkan bahwa bahan ini diekspresikan pertama kali pada saat fase pertumbuhan eksponensial (Lowy, 1998). Beberapa protein permukaan menampakkan 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 struktural dan fungsional protein ini termasuk MSCRAMMs yang termasuk di dalamnya adalah *fibronectin* dan *collagen-binding protein* (Foster & McDevitt, 1994), dan juga clumping factor yang merupakan protein berfungsi mengikat fibrin dan mempromosi terbentuknya gumpalan darah pada jaringan traumatik (Todar, 2002).

Setelah terjadi kolonisasi, *Staphylococcus 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. Patogenesis dari kondisi ini disebabkan oleh kemampuan toksin untuk menghancurkan sel eukaryotik. Pada *epithelium pulmonary*, pembengkakan osmotik menyebabkan pecahnya integritas sel dengan efek meningkatkan *vascular permeability*. Efek pada hospes adalah *pulmonary oedema* atau *respiratory stress syndrome* pada orang dewasa. Produksi dari *haemolytic pore-forming & pro-inflammatory toxins*, *pyrogenic-toxins* atau *exfoliative toxins* memudahkan *Staphylococcus aureus*

untuk menyebar ke jaringan sekitarnya dan cenderung diproduksi selama fase stasioner dari infeksi (Dinges, 2000, Lowy, 1998).

Potensi infeksi *Staphylococcus aureus* dapat dikaitkan pada koordinasi regulasi temporal dari faktor virulensi. Pada awal infeksi *Staphylococcus aureus*, faktor virulensi diekspresikan untuk adhesi pada sel hospes dan terjadi kolonisasi seperti *collagen*, *fibronektin 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).

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 *adhesions* dan enzim ekstraselluler seperti *hyaluronidases*, *proteases*, *collagenases* yang memfasilitasi terjadinya invasi. Bakteri menghindari fagositosis dengan ekspresi koagulase, *leukocidin*, *haemolysins*, katalase dan menahan respon imun oleh beberapa variasi antigenik 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).

Pola *band* yang terekspresi pada gambar 5.8 menunjukkan pola *band* yang sama di antara ke empat isolat *Staphylococcus aureus* yang berasal dari 4 lokasi yang berbeda, pola *band* yang sama yang menunjukkan adanya kesamaan protein yang diekspresikannya. Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian Lusiasuti dan Effendi (2005) yang menggunakan pewarna *Cornasie blue* yang menghasilkan pola *band* yang sama pada isolat *Staphylococcus aureus* dari 4 lokasi yang berbeda dan lebih jelas gambarannya. Hal ini dibuktikan dengan tidak dipengaruhinya ekspresi protein permukaan bakteri oleh suhu inkubasi yang berbeda seperti yang terlihat pada gambar 5.8 dan 5.9, yang berarti pengaruh lingkungan seperti perbedaan suhu dan perbedaan geografis kurang memberikan pengaruh terhadap ekspresi protein permukaan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Beberapa protein permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* ditemukan terikat kovalen pada dinding sel *peptidoglycan* dengan mekanisme yang memerlukan ikatan ujung COOH pada motif LPXTG (Navarre and Schneewind, 1999). Sintesis protein permukaan ini terjadi pada pertumbuhan awal dan diregulasi secara menurun pada *post exponential* dan fase pertumbuhan stasioner (Projan and Novick, 1997). Hal ini berarti variabilitas strain *Staphylococcus aureus* tidak bisa dibuktikan dengan menggunakan pendekatan fenotipik yang menggunakan ekspresi protein gen penyandi permukaan bakteri.

6.5 Uji Sensitivitas Antibiotika pada *Staphylococcus aureus*

Uji sensitivitas antibiotika mempunyai fungsi dalam pengobatan manusia maupun pada hewan. Utamanya, hal ini dapat digunakan untuk pilihan pengobatan antimikrobia dan lainnya untuk memonitor resistensi antimikrobia. Metode Kirby-Bauer yang menggunakan *agar disk diffusion* menghasilkan kategori yang bersifat kualitatif dengan penilaian sensitif, intermediate dan resisten. Perkembangan dari resistensi antibiotika dalam bakteri adalah disebabkan dua hal penting yaitu penggunaan antibiotika yang berlebihan dan adanya gen resisten. Ada hubungan yang sangat erat antara perkembangan resistensi antibiotika dengan jumlah penggunaan antibiotika (Lopez-Lozano *et al*, 2000). Resistensi antibiotika melalui empat mekanisme utama : pemindahan tempat target dari antibiotika (seperti perubahan dalam *penicillin binding proteins*), pemecahan obat dan inaktivasi enzimatik dari antibiotika (*penisilinases*), perubahan permeabilitas dinding sel yang mencegah masuknya antibiotika, dan peningkatan aktifitas tekanan dalam sel yang mencegah akumulasi antibiotika di dalam sel (Wise, 1999). Mekanisme kenaikan tekanan dalam sel juga diidentifikasi yang dapat mencegah akumulasi antibiotika dalam sel bakteri (Pechere, 2001).

Hasil analisis statistik terhadap uji sensitivitas ampisilin pada *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang sangat signifikan antara ke empat peternakan sapi perah, dan beberapa isolat *Staphylococcus aureus* dari Nongkojajar memperlihatkan resistensi terhadap ampisilin. Hal tersebut berdasarkan pada rata-rata diameter zona hambat (mm)

zona yang terbentuk dari isolat Surabaya ($25,72 \pm 6,26$) , isolat Grati ($31,07 \pm 3,12$), isolat Batu ($33,73 \pm 1,85$) dan isolat Nongkojajar ($18,71 \pm 7,76$).

Hasil analisis statistik terhadap uji sensitivitas penisilin pada *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang sangat signifikan antara ke empat peternakan sapi perah dan beberapa isolat *Staphylococcus aureus* dari Nongkojajar memperlihatkan resistensi terhadap penisilin. Hal tersebut berdasarkan pada rata-rata diameter zona hambat (mm) zona yang terbentuk dari isolat Surabaya ($25,56 \pm 6,62$) , isolat Grati ($31,00 \pm 2,77$), isolat Batu ($32,46 \pm 1,50$) dan isolat Nongkojajar ($18,07 \pm 6,60$).

Meskipun secara analisis statistik tidak berbeda nyata pada rata-rata zona hambat yang terbentuk dari isolat Surabaya ($16,21 \pm 5,23$), isolat Grati ($17,31 \pm 2,87$), isolat Batu ($18,21 \pm 4,33$), dan isolat Nongkojajar ($14,44 \pm 3,77$), tetapi berdasarkan perbandingan persentase maka isolat Surabaya 40% , isolat Grati 15%, isolat Batu 33% dan isolat Nongkojajar 62% yang resisten terhadap *cephalexin*.

Antibiotika β -laktam adalah merupakan antibiotika yang sering digunakan dalam pengobatan mastitis pada sapi perah. Antibiotika ini mempunyai aktifitas dalam *Staphylococcus aureus* melalui interaksi tiga molekul yang berat dan satu molekul yang ringan pada *penicillin binding proteins*. Fungsi yang spesifik dari *penicillin binding proteins* belum begitu jelas, tetapi mempunyai efek pada sintesis dinding sel *peptidoglycan* dan pertumbuhan sel (Hakenbeck and Coyette, 1998).

Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika β -laktam merupakan masalah yang cukup banyak ditemukan di beberapa negara (Vavra *et al.*, 2003), strain seperti ini akan menjadi lebih tinggi prevalensinya jika pengobatan dengan antibiotika β -laktam tidak didasarkan pada dosis dan penggunaan yang tepat, hal ini didukung oleh penelitian Siswanto dan Effendi (2004) yang memaparkan bahwa kebanyakan bakteri *Staphylococcus aureus* isolat Surabaya resisten terhadap *cephalexin* yang merupakan kelompok antibiotika β -laktam tetapi untuk bakteri *Coagulase Negative Staphylococci* (CNS) isolat Surabaya sensitif terhadap *cephalexin*.

Pengetahuan tentang salah satu mekanisme resistensi antibiotika β -laktam dengan menghambat biosintesis dinding sel (Vavra *et al.*, 2003). Antibiotika β -laktam mengikat dan menghambat *penicillin binding proteins* (PBPs) yang merupakan enzim untuk sintesis *peptidoglycan*, pertumbuhan sel dan morfogenesis (Pinho *et al.*, 1998). Pemahaman tentang faktor yang mempengaruhi ekspresi PBPs dapat digunakan untuk pencarian alternatif pengobatan yang tepat.

Penisilin dan ampisilin mempunyai sifat antara lain sebagai antibiotika β -laktam yang mampu menanggulangi enzim β -laktamase dan mengikat PBP 2a pada konsentrasi yang sangat rendah (Katayama *et al.*, 2003). Resistensi terhadap penisilin, ampisilin dan *cephalexin* untuk isolat *Staphylococcus aureus* dari peternakan Nongkojajar mungkin disebabkan adanya gen PBP 4. Gen PBP 4 merupakan gugusan PBP yang mempunyai BM rendah dan terkait dengan resistensi antibiotika β -laktam (Katayama *et al.*, 2003), dan mungkin PBP 4

menyebabkan kemampuan untuk mentoleransi antibiotika β -laktam. Sifat PBP 4 menyebabkan *deacylates penicillin* sekitar 10 – 20 lebih cepat dibandingkan dengan PBP yang mempunyai BM tinggi (Goffin and Ghuyesen, 1998), hal ini dimungkinkan karena PBP 4 mengikat penisilin dan ampisilin pada konsentrasi yang lebih tinggi (Goffin and Ghuyesen, 1998). Beberapa molekul PBP 4 yang tidak terikat pada tingkat konsentrasi yang sudah mengikat molekul PBP 2 akan mentoleransi antibiotika β -laktam yang diberikan.

Pada penelitian Vavra *et al.*, (2003) memperlihatkan bahwa transkripsi *pbp B* dan *prf A* pada *Staphylococcus aureus* dimodulasi dalam respon fase pertumbuhan dan menginduksi dinding sel. Penelitian tersebut juga mendemonstrasikan bahwa peningkatan produksi PBP 2 disebabkan peningkatan transkripsi dari gen *pbp B*. Hal ini berarti bahwa untuk menjaga kehidupan *Staphylococcus aureus* maka bakteri tersebut meningkatkan transkripsi *prf A* –*pbp B* yang berfungsi mengakselerasi sintesis dinding sel dalam rangka menanggulangi efek kerusakan yang ditimbulkan oleh antibiotika ampisilin dan penisilin.

Pada fase pertumbuhan *Staphylococcus aureus* mensekresi beberapa faktor virulensi termasuk di dalamnya yang terkait dengan pembentukan dinding sel dikendalikan oleh sistem *agr quorum sensing* dan regulasi *global sar A* (Novick *et al.*, 1993). Piriz Duran *et al.*, (1996) menyatakan bahwa inaktivasi gen *agr* dan *sar* tidak dipengaruhi oleh aktivitas PBP 2. Konsep tersebut didukung oleh Vavra *et al.*, (2003) bahwa ekspresi *pbp B* menentukan dan menginduksi Sar A untuk terkait dengan resistensi antibiotika.

Aktivitas PBP 2 adalah mempengaruhi metabolisme dinding sel dan resistensi terhadap antibiotika β -laktam. Peningkatan ekspresi pbp B dalam respon adanya antibiotika β -laktam sejalan dengan penemuan bahwa PBP 2 berkoordinasi dengan PBP 2a dalam sintesis peptidoglycan ketika adanya antibiotika β -laktam (Pinho *et al.*, 2001).

Meskipun hasil analisis statistik terhadap uji sensitivitas eritromisin pada *Staphylococcus aureus* dengan uji Kruskal-Wallis tidak menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara ke empat peternakan sapi perah, tetapi isolat *Staphylococcus aureus* dari Surabaya memperlihatkan resistensi terhadap eritromisin dengan zona hambat 0 mm dengan presentase 60% isolat Surabaya. Merujuk data yang tersedia berdasarkan pada rata-rata diameter zona hambat (mm) zona yang terbentuk adalah dari isolat Surabaya ($6,79 \pm 10,31$), isolat Grati ($20,95 \pm 1,47$), isolat Batu ($20,36 \pm 2,93$) dan isolat Nongkojajar ($18,88 \pm 6,82$).

Hasil penelitian ini menggambarkan adanya hubungan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahardjo *et al.*, (1999) yang menyatakan bahwa bakteri yang diisolasi dari daging sapi maupun daging ayam yang beredar di Surabaya 92% resisten terhadap eritromisin, dan juga didukung oleh penelitian Siswanto dan Effendi (2004) yang menerangkan bahwa isolat Surabaya yang berupa bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Coagulase Negative Staphylococci* (CNS) resisten terhadap eritromisin. Hal ini juga berarti ada kesesuaian dengan yang diteliti oleh Khan *et al.*, (2000) yang menyatakan dapat terjadinya perpindahan

resistensi terhadap eritromisin dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal ayam ke bakteri *Staphylococcus aureus* yang berada pada manusia.

Eritromisin adalah sebuah antibiotika makrolida yang juga sering digunakan pada pengobatan *intramamary* dan tersedia dalam pengobatan pada masa laktasi ataupun masa kering. Eritromisin mengikat 50S ribosomal pada bakteri Gram positif (Nicola *et al.*, 1998). *Staphylococcus aureus* membentuk formasi sub unit ribosom dan salah satunya adalah 50 S sub unit ribosom. Eritromisin mencegah formasi terbentuknya 50 S ribosom. Penghambatan translasi terkait dengan aktivitas *peptidyltransferase* dari 50 S sub unit (Nicola *et al.*, 1998), penghambatan eritromisin terjadi dalam tahap translasi antara proses inisiasi dan elongasi.

Beberapa strain *Staphylococcus aureus* mempunyai *eritromisin-resistant methylase genes* (*ermA*, *ermB* dan *ermC*) (Pechere, 2001) yang menyandi pemindahan dalam ribosomal RNA dengan fungsi mencegah pengikatan makrolida dan menghasilkan resistensi tingkat tinggi. Perpindahan secara kromosomal gen *ermA* terkait dengan transposon Tn 554 (Philipps and Novick, 1979) yang mengindikasikan perpindahan resistensi obat yang dimediasi oleh *transposon*.

Pada penelitian Khan *et al.* (2000) menggambarkan bahwa penggunaan antibiotika pada manusia bisa merupakan ancaman bagi hewan dengan meningkatkan resistensi beberapa bakteri dan resistensi bisa dipindahkan pada tingkatan interspesies dan antar genus. Penyebaran resistensi agen

antimikrobia pada *Staphylococcus aureus* disebabkan oleh penyebaran plasmid dan *transposon* (Lyon and Skurray, 1987).

Meskipun perpindahan resistensi antara strain *Staphylococcus aureus* dalam percobaan laboratorium terjadi via *transformation*, *transduction* dan *conjugation* (Lacey, 1975), hanya *conjugation* tampak secara signifikan secara *in vivo* (McGowan, 1991). Studi dengan strain *staphylococcal* yang diisolasi dari manusia mengindikasikan bahwa *Staphylococcus epidermidis* adalah sumber penyakit gen resistensi antibiotika yang dapat dipindahkan ke *Staphylococcus aureus* dalam kondisi *in vivo* maupun *in vitro* (Forbes and Schaberg, 1983).

Sementara hasil analisis statistik uji sensitifitas *ciproxin* dan tetrasiklin pada *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara ke empat peternakan sapi perah, hal ini berarti ke empat peternakan sapi perah tersebut isolat *Staphylococcus aureus* yang diisolasinya sensitif terhadap ke dua antibiotika tersebut.

6.6 Hasil Temuan

Pada penelitian ini diperoleh hasil temuan yang merujuk pada hasil penelitian dan pembahasan sebagai berikut :

1. Prevalensi mastitis di peternakan sapi perah Jawa Timur berkisar antara 80 sampai 86%.
2. Mayoritas bakteri yang diisolasi dari mastitis klinis adalah *Coagulase Negative Staphylococci*.

3. *Staphylococcus aureus* bukan merupakan mayoritas agen penyebab mastitis pada sapi perah di Jawa Timur.
4. Untuk penentuan *strain Staphylococcus aureus* dapat digunakan gen penyandi permukaan bakteri.
5. Karakterisasi protein permukaan bakteri menunjukkan adanya persamaan pola *band* antara keempat peternakan sapi perah di Jawa Timur.
6. Secara fenotipik penggunaan uji sensitivitas antibiotika dapat dijadikan sebagai alat untuk mencari variabilitas *strain Staphylococcus aureus*.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian secara keseluruhan pada penelitian ini memperlihatkan tiga pokok hal sebagai berikut :

1. Gen Penyandi Koagulase (*coa*) dan gen penyandi protein A (*spa*) dapat menentukan adanya variabilitas genetik *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari mastitis sapi perah di Jawa Timur.
2. Ekspresi protein gen penyandi protein permukaan bakteri *Staphylococcus aureus* tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan.
3. Variabilitas fenotipik berdasarkan uji resistensi antibiotika memperlihatkan isolat *Staphylococcus aureus* dari Nongkojajar resisten terhadap penisilin dan ampisilin, sedangkan kebanyakan isolat *Staphylococcus aureus* dari Surabaya resisten terhadap eritromisin.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disampaikan beberapa saran sebagai berikut :

1. Penemuan adanya perbedaan genetik antara beberapa peternakan sapi perah dapat digunakan untuk pengembangan penelitian lanjutan bagi peneliti ke arah pembuatan vaksin pencegah *Staphylococcal mastitis*.

2. Coa, spa dan clfA adalah gen penyandi protein permukaan bakteri yang berhubungan dengan kemampuan perlekatan *Staphylococcus aureus* dengan sel hospes, akan tetapi alangkah baiknya kalau bisa dilakukan penelitian untuk menguji faktor virulensi yang berhubungan dengan *exoprotein Staphylococcus aureus* seperti hemolysin atau toksin *Staphylococcus aureus* yang berperan dalam proses degradasi komponen imunologik sel hospes.



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.
- Baggiolini, M.A., B. Dewald, and B. Moser. 1997. Interleukin-8 and related Chemotactic Cytokines-CXC and CC Chemokines. *Adv. Immunol*, 55: 97-179.
- Barber, M.R. and T.J. Yang. 1998. Chemotactic Activities in Nonmastitic and Mastitic Mammary Secretion: Presence of Interleukin-8 in Mastitic but not Nonmastitic Secretions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 5: 82-86.
- Barker, A.R., F.N. Schrick, M.J., H.H. Dowlen, and S.P. Oliver. 1998. Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *J. Dairy Sci*. 81: 1285.
- Bauman, H., and J. Gauldie. 1994. The Acute Phase Response. *Immunol. Today* 15: 74-80.
- Bewley, J., R.W. Palmer, and D.B. Jackson-Smith. 2001. A Comparison of Free-Stall Barns by Modernized Wisconsin Dairies. *J. Dairy Sci*. 84: 528-541.
- Bhakdi, S and J. Trantum-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
- Boudjellab, N., H.S. Chang-Tang, and X. Zhao. 2000. Bovine Interleukin-1 Expression by Cultured Mammary epithelial Cells (MAC-T) and Its involvement in the Release of MAC-T Derived Interleukin-8. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 127: 191-199.
- Boerlin, P., P. Kuhnert, D. Hüsey, and M. Schaefflibaum. 2003. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. *J. Clin. Microbiol*. 41: 767-771
- Bramley, A.J., J.S. Cullor, R.J. Erskine, L.K. Fox, R.J. Harmon, J.S. Hogan, S.C. Nickerson, and L.M. Sordillo. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison.

- Buck, M.A., and B.C. Cooperman. 1990. Single Protein Omission Reconstitution Studies of Tetracycline Binding to the 30S Subunit of *Escherichia coli* Ribosomes. *Biochemistry*, 29: 5374-5379.
- 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.
- Chein, Y., and A.L. Cheung. Molecular Interactions Between Two Global Regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. 1998. *J. Bacteriol. Chem.*, 273: 2645-2652.
- Chusniati, S. dan M.H. Effendi. 2003. Sensitivitas Koagulase *Slide test* Untuk Deteksi *Staphylococcus aureus* pada Kasus Mastitis Sapi Perah. Laporan Penelitian, LPPM-Universitas Airlangga.
- Cifrian, E., A.J. Guidry, C.N. O'Brien, S.C. Nickerson, and W.W. Marquardt. 1994. Adhere of *Staphylococcus aureus* to Cultured Bovine Mammary Epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* 77: 970.
- 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.
- Craven, N., and J.C. Anderson. 1984. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Bovine Mammary Gland Macrophages and Intracellular Protection from Antibiotic Action in Vitro and In Vivo. *J. Dairy Res.* 51: 513.
- 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.
- Departement of Animal Science. 2003. Mastitis in Dairy Cows. Faculty of Agricultural & Environmental Sciences, Macdonald Campus of McGill University.
- Department of Veterinary Science. 2005. Mammary Gland Diseases. www.cptc.ncsu.edu

- Deora, R., T. Tseng and T.K. Misra. 1997. Alternative Transcription Factor σB of *Staphylococcus aureus* : Characterization and Role in Transcription of the Global regulatory Locus *sa*. J. Bacteriol. 179, 6355 – 6359.
- Deivayagam, C.C.S., E.R. Wann, W. Chen, M. Carson, and V.L. Narayana. 2002. A Novel Variant of the Immunoglobulin Fold in Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*: Crystal structure of the Fibrinogen-Binding MSCRAMM, Clumping Factor. The EMBO J., 21: 6660-6672.
- Dinarello, C.A. 1999. Interleukin-1: a proinflammatory cytokine. in: Snyderman, J.I. (Ed), Inflammation: basic principles and clinical correlates. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 443-461.
- Dinges, M.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. 13, 16 – 34.
- Eckmann, L., M.F. Kagnoff, and J. Fierer. 1993. Epithelial Cells secrete the Chemokine Interleukin-8 in Response to Bacterial Entry. Infect. Immun. 61: 4569-4574.
- Effendi, M.H., Kuntaman, dan A.T.S. Estoe pangestie. 2005. Isolasi dan Identifikasi Gen Penyandi Protein A sebagai Faktor Virulensi dari *Staphylococcus aureus* pada Kasus Mastitis Sapi Perah. Laporan Penelitian, LPPM-Universitas Airlangga, Surabaya.
- Erskine, R.J., R.D. Walker, C.A. Bolin, and D.G. White. 2002. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven-year Period. J. Dairy Sci. 85: 1111-1118.
- Espevik, T., M. Brockhaus, H. Loetscher, and U. Nonstad. 1990. Characterization of binding and Biological Activities of Monoclonal Antibodies Against a Human Tumor necrosis factor Receptor. J. Exp. Med, 171: 415-426.
- Forbes, B.A., and D.R. Schaberg. 1983. Transfer of Resistance Plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence of Conjugative Exchange of Resistance. J. Bacteriol. 153: 627-634.
- 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.
- Fox, L.K., S.T. Chester, J.W. Hallberg, and L.D. Weaver. 1995. Survey of Intramammary Infections in Dairy Heifers at Breeding Age and First Parturition. J. Dairy Sci. 78: 1619.

Fox, L.K., W.A. Ferens, G.A. Bohach and W.C. Davis. 2000. *Staphylococcus aureus*: Super mastitis Pathogen. Annu.Meet. Natl. Mastitis Counc., Inc. Atlanta.

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.

Goffin, C., and J.M. Ghuysen. 1998. Multimodular Penicillin-Binding Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 1079-1093.

Goldman, R.A., T. Hasan, C.C. Hall, and B.S. Cooperman. 1983. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli*. Identification of the Major Proteins Photolabeled by Native Tetracycline Photoproducts and Implications for the Inhibitory Action of Tetracycline on Protein Synthesis. *Biochemistry*, 22: 359-368.

Green, M.J. 2003. Clinical Mastitis in Dairy Cows: Studies of Bacterial Ecology and somatic Cell Count Patterns. Doctoral Thesis, University of Warwick.

Guidry, A.J., C.N. O'Brien, and L.W. Douglass. 1994. Effect of Whole *Staphylococcus aureus* and Mode of Immunization on Bovine Opsonizing Antibodies to Capsule. *J. Dairy Sci.* 77: 2965.

Harda, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and k. Matsushima. 1994. Essential Involvement of Interleukin-8 in Acute Inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56: 559-564.

Harms, J.M., H. Bartels, F. Schlunzen, and A. Yonath. 2003. Antibiotics acting on the translational machinery. *J. Cell. Sci.* 116: 1391-1393.

Hartleib, J., N. Kohler, R.B. Dickinson, G.S. Chatwal, and M. Hermann. 2000. Protein A is the von Willebrand Factor Binding Protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*, 96: 2149-2158.

Haris, L.G., S.J. Foster and R.G. Richards. 2003. An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins in Relation to Adhesion to Biomaterials : Review. Academic Paper, AO Research Institute, Switzerland.

Hakenbeck, R. and J. Coyette. 1998. Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. Life.* 54: 332.

Heinrichs, A.J., S.J. Welis, and W.C. Losinger. 1995. A Study on the Use of Milk Replacers for Dairy Calves in the United States. *J. Dairy Sci.* 78: 2831-2837.

Hockett, M.E., F.M. Hopkins, M.J. Lewis, and F.N. Schrick. 2000. Endocrine Profiles of Dairy Cows Following Experimentally Induced Clinical mastitis During Early Lactation. *Animal Repro. Sci.* 58: 241- 251.

Hohmann, H.P., R. Remy, M. Brockhaus, and A.P. van Loon. 1989. Two Different Cell Types have Different Major Receptors for Human Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha). *J. Biol. Chem.* 264: 14927-14934.

Hooper, D.C. 2001. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infect. Dis.* 7: 337-341.

Hospido, A., and U. Sonesson. 2005. The Environmental Impact of Mastitis : A Case Study of Dairy Herds. *Science of the Total Environment* 343 : 71 – 82.

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.

Jaenicke, E.C., R.K. Roberts, H.H. Dowlen, and S.P. Oliver. 1999. Economic Benefit Associated with Antibiotic Treatment of Heifers Before Calving. *Annu. Meet. Natl. Mastitis Council., Arlington.*

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

Jones, G.M., R.E. Pearson, G.A. Clabaugh, and C.W. Heald. 1984. Relationship Between Somatic Cell Counts and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 67: 1823.

Katayama, Y , H.Z. Zhang, and H.F. Chambers. 2003. Effect of Disruption of *Staphylococcus aureus* PBP4 Gene on Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 9: 329-336.

Khachatourians, G.G. 1998. Agricultural Use of Antibiotics and The Evaluation and Transfer of Antibiotic Resistant Bacteria. *CMAJ* 159, 1129-1136.

Khan, S.A., M.S. Nawez, A.A Khan, and Cerniglia. 2000. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strain of *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1832.

- Kishimoto, T.K., M.A. Jutila, E.L. Berg, and E.C. Butcher. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 Adhesion Proteins Inversely Regulated by Chemotactic Factors. *Science*. 245: 1238-1241.
- Kuzma, K., E. Malinowski, H. Lassa, and A. Klossowska. 2005. Analysis of Protein A Gene polymorphisms in *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 49: 41-44.
- Lacey, R.W. 1975. Antibiotic Resistance Plasmids of *Staphylococcus aureus* and Their Clinical Importance. *Bacteriol. Rev.* 39: 1-32.
- 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.
- Levy, S.B. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 25-30.
- 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 Reseptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 28, 655 – 662.
- Livermore, D.M. 1995. β -lactamase in Laboratory and Clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584.
- Livermore, D.M. and D.F.J. Brown. 2001. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J. Antimicro. Chemother.* 48: 59-64.
- Lopez-Lozano, J.M., D.L. Monnet and M. Sacz. 2000. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Intl. J. Antimicrob. Agents.* 14: 21.
- 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.
- Lowy, F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111:1265-1273.

Lusiastuti, A.M., dan M.H. Effendi. 2005. Perbedaan Komponen Protein Permukaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* Penyebab *Bovine Mastitis*. Laporan Penelitian, LPPM-Universitas Airlangga, Surabaya.

Lyon, B.R., and R.A. Skurray. 1987. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol. Rev.* 51: 88-134.

Martin, S.W., A.H. Meek and P. Willeberg. 1987. *Veterinary Epidemiology*. Iowa State University Press, USA.

Matthews, K.R., J.J. Rejman, J.D. Turner, and S.P. Oliver. 1994. Proliferation of a Bovine Mammary Epithelial Cell Line in The Presence of Bacterial Virulence Factors. *J. Dairy Sci.* 77: 2959.

McAllister, T.A., L.J. Yanke., G.D. Inglis., and M.E. Olson. 2001. Is antibiotic use in dairy cattle causing antibiotic resistance. *Adv. Dairy technol.* 13: 229-2247.

McGowan, J.E.Jr. 1991. Abrupt Changes in Antibiotic Resistance. *J. Hosp. Infect.* 18: 202-210.

Medical Letter on Drugs and Therapeutics. 2000. *Chemotherapy of Infection*. USA.

Michalova, E., P. Novotna, and J. Schlegelova. 2004. Tetracycline in Veterinary Medicine and Bacterial Resistance to Them. *Vet. Med,-Czech*, 49: 79-100.

Moellering, R.C. 1990. Principles of anti-effective therapy. In: Mendel G.I., R.G. Douglas, and J.E. Bennet (Eds): *Principles and Practice of Infectious Disease*. Churchill Livingstone Inc., N.Y. pp. 206-218.

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

Morfeldt, E., D. Taylor, A. Von Gabain and S. Arvidson. 1996. Detection of the Response Regulator Agr A in th 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.

Mylotte, J.M. 2003. Genus *Staphylococcus*. Buffalo School of Medicine and Biomedical Sciences. www.smbs.buffalo.edu/id

Navarre, W.W., and O. Schneewind. 1999. Surface Proteins of Gram Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targetting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 174-229.

Nickerson, S.C. 1988. Immunity and the Bovine Mammary Gland : Spesific Defenses and Celluler immune mechanisms. *Agri-Pract.* 9: 32.

Nicola, F.G., Linda K. McDougal, James W. Biddle, and Fred C. Tenover. 1998. Characterization of Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* Recovered in the United States from 1958 through 1969. *Antimicrob Agents Chemother.*, 42: 3024-3027.

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.

Norman, C.B. 2004. Efficacy of Prepartum Intramammary Lactating Cow Treatment in Dairy Heifers. Thesis, The Louisiana State University, USA.

Novick, R., H. Ross, S. Projan, J. Korublum and S. Moghazeh. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatpry RNA molecule. *EMBO J.* 12: 3967-3975.

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.

Oliver, S.P., M.J. Lewis, B.E. Gillespie, and H.H. Dowlen. 1992. Influence of Prepartum Antibiotic Therapy on Intramammary Infections in Primigravid Heifers During Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 75: 406.

Oliver, S.P., M.J. Lewis, B.E. Gillespie, H.H. Dowlen, E.C. Jaenicke, and R.K. Roberts. 2003. Prepartum Antibiotic Treatment of Heifers: Milk Production, Milk Quality and Economic Benefit. *J. Dairy Sci.* 86: 1187.

Owens, W.E., J.E. Watts, S.C. Nickerson, and R.L. Boddie. 1988. Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies. *J. Dairy Sci.* 71: 3143.

Owens, W.E., and S.C. Nickerson. 1990. Treatment of *Staphylococua aureus* Mastitis with Piniillin and Novobiocin: Antibiotic Concentrations and Bacteriologic Status in Milk and Mammary Tissue. *J. Dairy Sci.* 73: 115.

Owens, W.E., S.C. Nickerson, R.L. Boddie, G.M. Tomita, and C.H. Ray. 2001. Prevalence of Mastitis in Dairy Heifers and effectiveness of Antibiotic Therapy. *J. Dairy Sci.* 84: 814.

Paape, M.J., P.M. Rautiainen, E.M. Lilius, C.E. Malstrom, and T.H. Elsasser. 2002. Development of Anti –Bovine TNF alpha mAb and ELISA for Quantitating TNF-alpha in Milk After Intramammary infection of endotoxin. *J. Dairy Sci.* 85: 765.

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.

Pankey, J.W. 1980. Immunization Against Bovine Mastitis. Annu. Meet. Natl. Mastitis Council, Michigan.

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.

Pechere, J.C. 2001. Macrolide resistance mechanism in Gram positive cocci. *Intl.J. Antimicrob. Agents.* 18: S25.

Pei, L . 2001. A Fibrinogen Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. Thesis, Karolinska University Press, Stockholm.

Pfaffl, M.W., S.L. Wittman, H.H. D. Meyer, and R.M. Bruckmaier. 2003. Gene Expression of Immunologically Important Factors in Blood Cells, Milk Cells, and Mammary Tissue of Cows. *J. Dairy Sci.* 86: 538-545.

Philipps, S., and R. P. Novick. 1979. Tn554 a site specific repressor-controlled transposon in *Staphylococcus aureus*. *Nature* 278:476-478

Pinho, M.G., H. Lencastre, and A. Tomasz. 2001. An Acquired and a Native Penicillin Binding Protein Cooperate in Building the Cell Wall of Drug-resistant *Staphylococci*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 21: 21.

Piriz Duran, S., F.H. Kayser, and B. Berger-Bachi. 1996. Impact of *sar* and *agr* on Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 255-260.

Prescott, J.F., J.D. Baggot, and R.D. Walker. 2000. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Iowa State University Press, USA.

- Pyorala, S. 2002. Antimicrobial Treatment of Mastitis – Choice of The Route of Administration and Efficacy. Proceeding of the British mastitis Conference, Brockworth, p 20-29.
- Rahardjo, D., N. Kataoka, E.B. Wasito, and L. Alimsardjono. 1999. Enteropathogenic Bacteria from Raw Mest and Its Susceptibility Against Antimicrobial Agents. Proc. Seminar on Infect. Dis. In the Tropics, Surabaya.
- Raimundo, O., M. Deighton, J. Capstick, and N. Gerraty. 1999. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* of Bovine origin by Polymorphisms of the Coagulase Gene. Vet. Microbiol., 66: 275-284.
- 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.
- Regassa, L.B., R. Novick and M.J. Betley. 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease Expression of the Accessory Gene Regulator in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 60, 3381 – 3388.
- Rice, L.B. 2000. Bacterial monopolists: The Bunding and Dissemination of antimicrobial Resistance genes in Gram Positive Bacteria. Clin Infect Dis. 31: 762-769.
- Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel. 2000. Defferential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines During Intramammary infections with *Esherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 161-167.
- Roberson, J.R. 1999. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* on Dairy Farms. Proc. Natl. Mastitis Council, USA.
- 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.
- Salasia, S.I.O., Z. Khusman, C. Lammler, and M. Zschock. 2004. Comparative Studies on Pheno-and Genotypic Properties of *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine Subclinical Mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. J. Vet. Sci., 5: 103-109.

Sawant, A.A. 2005. Descriptive and Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistant Gram Negative Enteric Bacteria from Dairy Cattle. Thesis, The Pennsylvanis State University, USA.

Schwarz, S., M.C. Robert, C. Werckenthin, and C. Lange. 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. From domestic to pet animals. *Vet. Microbiol.* 63: 217-228.

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.

Schrack, F.N., M.E. Hockett, and H.H. Dowlen. 2001. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407.

Sears, P.M., and A.P. Belschner. 1998. Eliminating *Staphylococcus aureus* Intramammary infections Using Immune Enhancement and Antibiotic Therapy. *Annu. Meet. Natl. Mastitis Council*, St. Louis.

Shannon, O. 2005. Biological Effects of Extraceluller Fibrinogen Binding Protein in *Staphylococcus* infection. Doctoral Thesis, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Sheagren, J.N. 1984. *Staphylococcus aureus* : The Persistent Pathogen. *The New England Journal of Medicine.* 310, 1368–1373.

Shibahara, T., and K. Nakamura. 1999. Pathology of Acute Necrotizing Mastitis by *Staphylococcus aureus* in a Dairy Cow. *Japan Agricultural Res. Quart.* 33: 2.

Shopsin, B., M. Gomez, S.O. Montgomery, and B.N. Kreiswirth. 1999. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3556-3563.

Sims, J.E., M.A. Gayle, J.L. Slack, M.R. Alderson, and S.K. Dower. 1993. Interleukin-1 signaling Occurs Exclusively via the type I Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6155–6159.

Siswanto, H.P. dan M.H. Effendi. 2004. Komparasi Uji Sensitivitas *in Vitro* antara *Staphylococcus aureus* dan *Coagulase Negative Staphylococci (CNS)* dari Kasus Mastitis Terhadap Beberapa Antibiotika. Laporan Penelitian, LPPM – Universitas Airlangga, Surabaya.

- Sordillo, L., N.L. Scott, and F.M. Aarestrup. 1995. *Staphylococcus aureus* Genotypes Show variable Resistance to Neutrophil Phagocytosis and Killing. Annu Meet. Natl. Mastitis Counc., Ft. Worth.
- Sudarwanto, M. 1999. Usaha Peningkatan Produksi Susu Melalui Program Pengendalian Mastitis Subklinis. Prosiding Seminar Nasional Mastitis, Bogor.
- Sutra, L and B. Poutrel. 1994. Virulence Factors Involved in the Patogenesis of Bovine Intramammary Infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 49, 79 – 89.
- Taylor, L.D. 2001. Antibiotic Resistance: Multi-drug Profiles and Genetic Determinants. Thesis, East Tennessee State University, USA.
- Tenover, F.C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, and M.A. Pfaller. 1994. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus* J. Clin Microbiol. 33: 2233-2239.
- Thomsberry, C. 1991. Antimicrobial susceptibility testing: general considerations. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 1059-1064.
- Tjay, T.H dan K. Rahardja. 1986. Obat-obat Penting : Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek sampingnya. PT. Kimia Farma, Jakarta.
- Todar, K. 2002. *Staphylococcus aureus*. University of Wisconsin, Dept of Bacteriology, Lecture Notes.
- Trinidad, P., S.C. Nickerson, T.K. Alley, and R.W. Adkinson. 1990. Efficacy of Intramammary Treatment in Unbred and Primigravid Dairy Heifers. J. Am.Vet. Med. Assoc. 197: 465.
- Vavra, S.B., S. Yin., M. Challapalli, and R.D. Daum. 2003. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in *Staphylococcus aureus* by Cell Wall Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. J. Antimicro. Agents and Chemother. 47 : 1028-1036.
- Vieira-da-Motta, O., M. M. Folly, and C. C. H. Sakyiama. 2001. Detection of Different *Staphylococcus aureus* Strain in Bovine Milk from Subclinical Mastitis Using PCR and Routine Techniques. Braz. J. Microbiol. 32: 1-5.
- Vuong, C., C. Gerke, and M. Otto. 2003. Quorum sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. 188: 706-718.

- Waage, S., A. Lund, S. Brattgjerd, and T. Rothe. 2001. Case-control Study of Risk factors for Clinical Mastitis in Postpartum Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.* 84: 392.
- Wang, H., and K.J. Tracey. 1999. Tumor Necrosis Factor, Interleukin-6, macrophage Migration Inhibitory Factor, and Macrophage Inflammatory protein-1 in Inflammation. In: Gallin, J.I., and R. Snyderman (Eds.), *Inflammation : Basic Principle and Clinical Correlates*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 471-486.
- Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature* 404: 775-781.
- Wann, E.R., S. Gurusiddappa and M. Hook. 2000. The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun.* 64, 3142-3147.
- Wielders, C.L. 2002. The Dissemination Among *Staphylococcus aureus* of Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) which Confers Multiresistance. Doctoral Thesis, University of Utrecht, Netherland.
- Willmott, C.J., S.E. Critchlow, and A. Maxwell. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 242: 351-363.
- Wise, R. 1999. A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. *Can. Resp. J.* 6 Suppl: 20A.
- Wisell, K.T. 2000. Regulation of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. Thesis, Karolinska University Press, Stockholm.
- Woltz, C., C. Goerke, R. Landmann, and U. Fluckiger. 2002. Transcription of Clumping Factor A in Attached and Unattached *Staphylococcus aureus* in Vitro and During Device related infection. *Infect. Immun.*, 70: 2758-2762.
- Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, and J.C. Mathison. 1990. CD14, a Reseptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein. *Science* 249: 1431-1436.
- Yao, J.D., and R.C. Moellering. 1991. Antimicrobial agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 1065-1099.
- Yarwood, J.M., and P.M. Schlievert. 2003. Quorum Sensing in *Staphylococcus* Infections. *J. Clin. Invest.* 112: 1620-1625.

Yulir, Y dan T. Widodo. 2003. Sosial Geografi. Penerbit Bumi Aksara, Jakarta.

Zadoks, R. 2002. Molecular and Mathematical Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Mastitis in Dairy Herds. Doctoral Thesis, University of Utrecht, Netherland.

Zdanowicz, M. 2002. Sand and Sawdust Bedding Affect Populations of Coliforms, Klebsiella spp. And Streptococcus spp. On Teat Ends of Dairy Cows Housed in Freestalls. Thesis, The University of British Columbia, USA.



Lampiran 1 : 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 (CfA)	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 (CfB)	Fg (α -, β -chains)	[Ni Eidin <i>et al.</i> 1998]
<i>sdhC</i>	SdhC	unknown	[Josefsson <i>et al.</i> 1998]
<i>sdhD</i>	SdhD	calcium	[Josefsson <i>et al.</i> 1998]
<i>sdhE, hbp</i>	SdhE: Hbp bone sialoprotein - binding protein	bone sialoprotein	[Josefsson <i>et al.</i> 1998, Tung <i>et al.</i> 2000]
<i>ply</i>	plasmin sensitive protein (Pis)	reduce adhetence	[Savolainen <i>et al.</i> 2004]
<i>fnA, fnB</i>	FnBP-A, FnBP-B	Fn, Fg (γ -chains) $\alpha 5 \beta 1$ (epithelial cells)	[Jostson <i>et al.</i> 1991, Miyamoto <i>et al.</i> 2001]
<i>cmi</i>	collagen-binding protein (Cna)	collagen	[Patt <i>et al.</i> 1992, Pars <i>et al.</i> 1994]
<i>spa</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>elbp</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) extracellular adhetence protein (Eap)	Fg, Fn, bone sialoprotein, Vn, thrombospondin, prothrombin, internalization	[McGavin <i>et al.</i> 1993] [Palma <i>et al.</i> 1999]
<i>vllp</i>	vWF-binding protein (vWbp)	vWF	[Ahlen <i>et al.</i> 2001]
<i>efb</i>	extracellular fibrinogen-binding protein (EFb)	Fg (α -chains)	[Boden & Fleck 1992, Palma <i>et al.</i> 1998]
<i>coa</i>	Coagulase	Fg, prothrombin	[Boden & Fleck 1989, Boden & Fleck 1992]
	thrombospondin-binding protein	thrombospondin	[Herrmann <i>et al.</i> 1991]
	laminin-binding protein	laminin	[Ropes <i>et al.</i> 1985]
<i>ica, ADBC</i>	intercellular adhesin poly-N-acetyl-beta-D-glucosamine	biofilm formation	[Cranton <i>et al.</i> 1999] [Cranton <i>et al.</i> 2001]
<i>shi</i>	Shi	IgG, apolipoprotein	[Zhang <i>et al.</i> 1998, Zhang <i>et al.</i> 1999, Zhang <i>et al.</i> 2000]

Lampiran 2 : Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus* yang berupa Enzim

(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>set6-13</i> <i>lpl1-9</i>	staphylococcal exotoxin-like proteins probable lipoproteins	superantigens induce proinflammatory cytokine production
enterotoxin	<i>egt, eca</i> <i>sep, see</i> <i>sea, seb</i> <i>sek, eeg</i> <i>splA-F</i> <i>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>hfb</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>pla</i>	phospholipase C	hydrolyzes phosphatidylinositol
<i>glt</i>	lipase	degrades lipids
<i>stk</i>	staphylokinase	nonphysiological activator of fibrinolysis (activating plasminogen)
<i>eta, eth</i>	exfoliative toxin A, B	destroys tissue, relative to SSSS (staphylococcal scalded skin syndrome)
<i>vspA, vspB</i>	proteases	destroys tissue
<i>nan</i>	thermonuclease	degrades nucleic acid

Lampiran 3 : Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika Ampisilin

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AMP10
N		31
Normal Parameters	Mean	27.5319
	Std. Deviation	7.7626
Most Extreme Differences	Absolute	.256
	Positive	.160
	Negative	-.256
Kolmogorov-Smirnov Z		1.428
Asymp. Sig. (2-tailed)		.034
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Oneway

Descriptives AMP10

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	25.7160	6.2620	2.8005	17.9407	33.4913	20.78	33.06
Grati	12	31.0692	3.1162	.8996	29.0893	33.0491	24.14	34.66
Batu	6	33.7300	1.8492	.7549	31.7894	35.6706	30.26	35.24
Nongkojir	8	18.7125	8.5155	3.0107	11.5934	25.8316	11.12	31.69
Total	31	27.5319	7.7626	1.3942	24.6846	30.3793	11.12	35.24

ANOVA AMP10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1019.388	3	339.796	11.637	.000
Within Groups	788.357	27	29.198		
Total	1807.744	30			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: AMP10
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DAERAH Surabaya	DAERAH Grati	-5.3532	2.8763	.074	-11.2548	.5484
	Batu	-8.0140	3.2720	.021	-14.7276	-1.3004
	Nongkojir	7.0035	3.0805	.031	.6828	13.3242
Grati	Surabaya	5.3532	2.8763	.074	-.5484	11.2548
	Batu	-2.6608	2.7018	.333	-8.2044	2.8828
	Nongkojir	12.3567	2.4664	.000	7.2961	17.4172
Batu	Surabaya	8.0140	3.2720	.021	1.3004	14.7276
	Grati	2.6608	2.7018	.333	-2.8828	8.2044
	Nongkojir	15.0175	2.9183	.000	9.0297	21.0053
Nongkojir	Surabaya	-7.0035	3.0805	.031	-13.3242	-.6828
	Grati	-12.3567	2.4664	.000	-17.4172	-7.2961
	Batu	-15.0175	2.9183	.000	-21.0053	-9.0297

* The mean difference is significant at the .05 level



Lampiran 4 : Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika *Ciproxin*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N		CIP5
Normal Parameters	Mean	31
	Std. Deviation	26.7994
Most Extreme Differences	Absolute	.061
	Positive	.055
	Negative	-.061
Kolmogorov-Smirnov Z		.342
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Oneway

Descriptives

CIP5

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	25.0260	3.3178	1.4838	20.9064	29.1456	20.68	28.48
Grati	12	27.8458	1.0960	.3164	27.1494	28.5422	26.54	29.62
Batu	6	26.6233	3.3504	1.3678	23.1073	30.1394	24.52	33.32
Nongkojir	8	26.4700	2.5645	.9067	24.3260	28.6140	23.44	30.24
Total	31	26.7994	2.5122	.4512	25.8779	27.7208	20.68	33.32

ANOVA

CIP5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.919	3	9.973	1.689	.193
Within Groups	159.410	27	5.904		
Total	189.329	30			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: CIP5
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
DAERAH Surabaya	DAERAH Grati	-2.8198	1.2934	.038	-5.4736	-.1660
	Batu	-1.5973	1.4713	.287	-4.6163	1.4216
	Nongkojir	-1.4440	1.3852	.306	-4.2862	1.3982
Grati	Surabaya	2.8198	1.2934	.038	.1660	5.4736
	Batu	1.2225	1.2149	.323	-1.2703	3.7153
	Nongkojir	1.3758	1.1091	.225	-.8998	3.6514
Batu	Surabaya	1.5973	1.4713	.287	-1.4216	4.6163
	Grati	-1.2225	1.2149	.323	-3.7153	1.2703
	Nongkojir	.1533	1.3123	.908	-2.5392	2.8459
Nongkojir	Surabaya	1.4440	1.3852	.306	-1.3982	4.2862
	Grati	-1.3758	1.1091	.225	-3.6514	.8998
	Batu	-.1533	1.3123	.908	-2.8459	2.5392

* The mean difference is significant at the .05 level



Lampiran 5 : Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika *Cephalexin*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N		CL30
Normal Parameters	Mean	31 16.5648
	Std. Deviation	3.8850
Most Extreme Differences	Absolute	.118
	Positive	.099
	Negative	-.118
Kolmogorov-Smirnov Z		.658
Asymp. Sig. (2-tailed)		.779
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Oneway

Descriptives

CL30

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	16.2100	5.2283	2.3382	9.7182	22.7018	10.68	23.92
Grati	12	17.3092	2.8707	.8287	15.4852	19.1331	13.88	22.32
Batu	6	18.2117	4.3269	1.7665	13.6708	22.7525	13.02	23.86
Nongkojir	8	14.4350	3.7676	1.3320	11.2852	17.5848	10.06	19.10
Total	31	16.5648	3.8850	.6978	15.1398	17.9899	10.06	23.92

ANOVA

CL30

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	59.840	3	19.947	1.370	.273
Within Groups	392.965	27	14.554		
Total	452.805	30			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: CL30
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DAERAH Surabaya	DAERAH Grati	-1.0992	2.0307	.593	-5.2658	3.0675
	Batu	-2.0017	2.3101	.394	-6.7416	2.7383
	Nongkojir	1.7750	2.1749	.422	-2.6875	6.2375
Grati	Surabaya	1.0992	2.0307	.593	-3.0675	5.2658
	Batu	-.9025	1.9075	.640	-4.8164	3.0114
	Nongkojir	2.8742	1.7413	.110	-.6987	6.4470
Batu	Surabaya	2.0017	2.3101	.394	-2.7383	6.7416
	Grati	.9025	1.9075	.640	-3.0114	4.8164
	Nongkojir	3.7767	2.0603	.078	-.4508	8.0041
Nongkojir	Surabaya	-1.7750	2.1749	.422	-6.2375	2.6875
	Grati	-2.8742	1.7413	.110	-6.4470	.6987
	Batu	-3.7767	2.0603	.078	-8.0041	.4508

* The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 6: Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika Eritromisin

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N	E15
Normal Parameters	Mean 18.8829 Std. Deviation 6.8203
Most Extreme Differences	Absolute .366 Positive .188 Negative -.366
Kolmogorov-Smirnov Z	2.038
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
a. Test distribution is Normal.	
b. Calculated from data.	

Descriptives

E15

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	6.7920	10.3061	4.6090	-6.0047	19.5887	.00	23.26
Grati	12	20.9458	1.4719	.4249	20.0106	21.8811	19.08	24.15
Batu	6	22.3650	2.9306	1.1964	19.2896	25.4404	20.42	28.24
Nongkojir	8	20.7338	1.7600	.6222	19.2624	22.2051	18.80	23.54
Total	31	18.8829	6.8203	1.2250	16.3812	21.3846	.00	28.24

Kruskal-Wallis Test

Ranks

E15	DAERAH	N	Mean Rank
	Surabaya	5	7.40
Grati	12	17.42	
Batu	6	21.50	
Nongkojir	8	15.13	
Total	31		

Test Statistics

Chi-Square	E15
	7.040
df	3
Asymp. Sig.	.071
a. Kruskal-Wallis Test	
b. Grouping Variable: DAERAH	

Lampiran 7: Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika Penisilin

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N		P10
Normal Parameters	Mean	31
	Std. Deviation	27.0700
Most Extreme Differences	Absolute	.165
	Positive	.137
	Negative	-.165
Kolmogorov-Smirnov Z		.918
Asymp. Sig. (2-tailed)		.369
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Oneway

Descriptives P10

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	25.5580	6.6224	2.9616	17.3353	33.7807	20.60	35.05
Grati	12	31.0025	2.7694	.7995	29.2429	32.7621	27.05	35.02
Batu	6	32.4600	1.5096	.6163	30.8758	34.0442	30.59	33.82
Nongkojir	8	18.0738	6.6020	2.3342	12.5543	23.5932	12.55	26.28
Total	31	27.0700	7.2917	1.3096	24.3954	29.7446	12.55	35.05

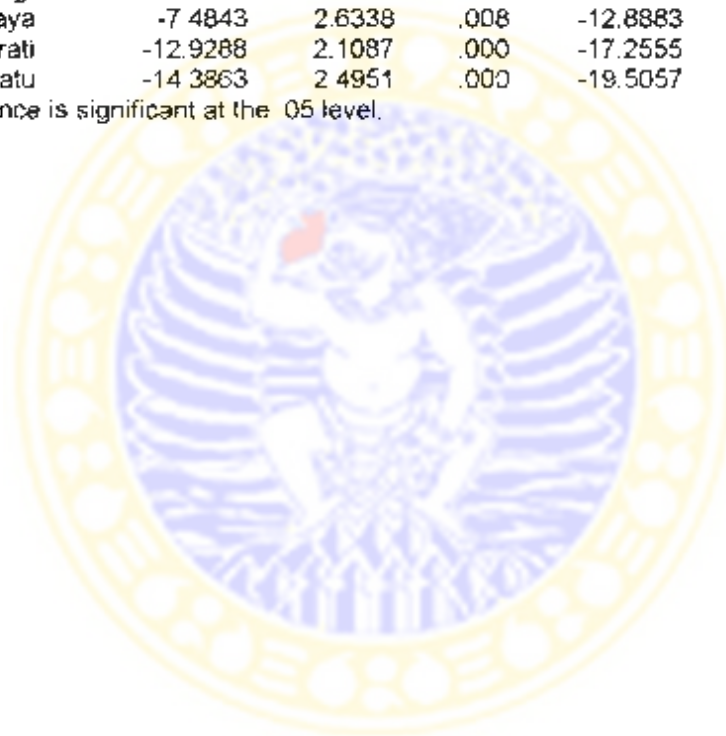
ANOVA P10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1018.778	3	339.593	15.910	.000
Within Groups	576.290	27	21.344		
Total	1595.068	30			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: P10
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
DAERAH Surabaya	Grati	-5.4445	2.4592	.035	-10.4903	-.3987
	Batu	-6.9020	2.7975	.020	-12.6421	-1.1619
	Nongkojir	7.4843	2.6338	.008	2.0802	12.8883
Grati Surabaya	Batu	5.4445	2.4592	.035	.3987	10.4903
	Batu	-1.4575	2.3100	.533	-6.1972	3.2822
	Nongkojir	12.9288	2.1087	.000	8.6020	17.2555
Batu Surabaya	Grati	6.9020	2.7975	.020	1.1619	12.6421
	Grati	1.4575	2.3100	.533	-3.2822	6.1972
	Nongkojir	14.3863	2.4951	.000	9.2668	19.5057
Nongkojir Surabaya	Grati	-7.4843	2.6338	.008	-12.8883	-2.0802
	Grati	-12.9288	2.1087	.000	-17.2555	-8.6020
	Batu	-14.3863	2.4951	.000	-19.5057	-9.2668

* The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 8: Analisis Statistik Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika Tetrasiklin

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N		TE30
		31
Normal Parameters	Mean	25.3945
	Std. Deviation	3.7880
Most Extreme Differences	Absolute	.183
	Positive	.133
	Negative	-.183
Kolmogorov-Smirnov Z		1.020
Asymp. Sig. (2-tailed)		.249
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Oneway

Descriptives

TE30

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Surabaya	5	26.2440	2.8093	1.2564	22.7558	29.7322	21.78	28.42
Grati	12	23.4983	5.0963	1.4712	20.2603	26.7364	11.34	29.79
Batu	6	27.1800	1.2313	.5027	25.8878	28.4722	25.01	28.56
Nongkojir	8	26.3688	2.1428	.7576	24.5773	28.1602	23.56	28.62
Total	31	25.3945	3.7880	.6803	24.0051	26.7840	11.34	29.79

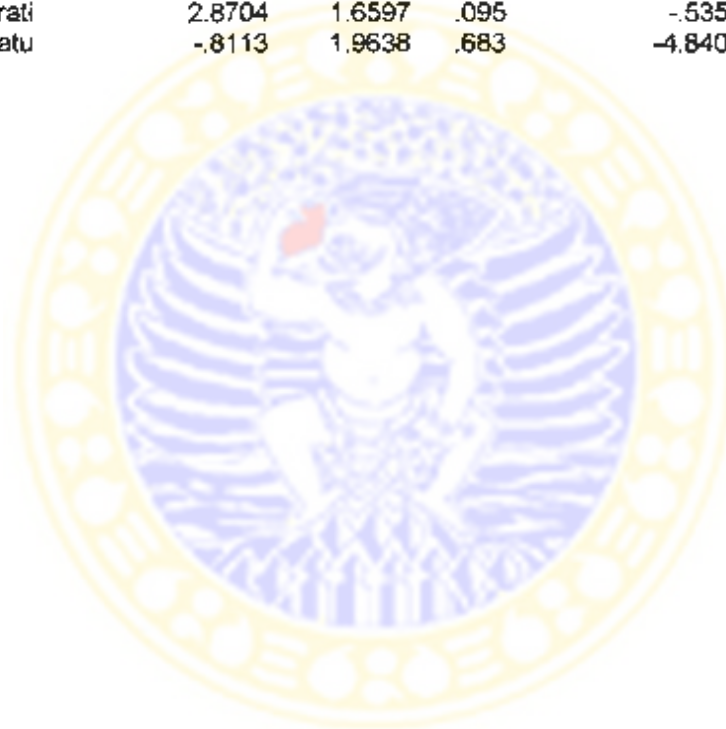
ANOVA

TE30

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	73.475	3	24.492	1.852	.162
Within Groups	356.988	27	13.222		
Total	430.463	30			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: TE30
LSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I)	(J)				Lower Bound	Upper Bound
DAERAH Surabaya	Grati	2.7457	1.9355	.167	-1.2257	6.7170
	Batu	-.9360	2.2018	.674	-5.4538	3.5818
	Nongkojir	-.1247	2.0729	.952	-4.3781	4.1286
Grati Surabaya	Batu	-2.7457	1.9355	.167	-6.7170	1.2257
	Batu	-3.6817	1.8181	.053	-7.4121	4.874E-02
	Nongkojir	-2.8704	1.6597	.095	-6.2758	.5350
Batu Surabaya	Grati	.9360	2.2018	.674	-3.5818	5.4538
	Grati	3.6817	1.8181	.053	-4.8744E-02	7.4121
	Nongkojir	.8113	1.9638	.683	-3.2181	4.8406
Nongkojir Surabaya	Grati	.1247	2.0729	.952	-4.1286	4.3781
	Grati	2.8704	1.6597	.095	-.5350	6.2758
	Batu	-.8113	1.9638	.683	-4.8406	3.2181



Lampiran 9: Teknik epidemiologi molekuler yang diaplikasikan pada agen penyebab *Staphylococcus aureus* (Zadoks, 2002)

Table 1. Overview of phenotypic and genotypic techniques used for strain typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle

Typing technique	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Phenotypic		
• antibiotic susceptibility	100/100	100/100
• serotyping	100/100	100/100
• bacteriophage typing	100/100	100/100
• inhibitor typing	100/100	100/100
• toxin typing	100/100	100/100
• phage typing	100/100	100/100
• immunodiffusion	100/100	100/100
• MEE ¹	100/100	100/100
Genotypic		
• plasmid profile	100/100	100/100
• plasmid RFLV ²	100/100	100/100
• chromosomal RFLV ²	100/100	100/100
• ribotyping	100/100	100/100
• coagulase typing	100/100	100/100
• spa typing	100/100	100/100
• rRNA spacer typing	100/100	100/100
• toxin gene typing	100/100	100/100
• PFGE ³	100/100	100/100
• RAPD ⁴	100/100	100/100
• binary typing	100/100	100/100

¹ MEE = multilocus enzyme electrophoresis

² RFLV = restriction enzyme analysis

³ PFGE = pulsed-field gel electrophoresis

⁴ RAPD = random amplified polymorphic DNA typing

Lampiran 10: Analisis Regresi Karakterisasi Protein Permukaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan suhu inkubasi 37° C.

panjang gel = 66 mm

Jarak Marker	Rf	BM (y kDa)	BM (y Da)	log BM y Da
5	0.076	200	200000	5.301
11	0.167	116.3	116300	5.066
19	0.288	97.4	97400	4.989
28	0.424	66.2	66200	4.821
44	0.667	31	31000	4.491
49	0.742	21.5	21500	4.332
59	0.894	14.4	14400	4.158

Regression

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf		Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: log BM

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.995	.991	.989	4.370E-02

- a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.047	1	1.047	548.293	.000
	Residual	9.549E-03	5	1.910E-03		
	Total	1.057	6			

- a. Predictors: (Constant), Rf
b. Dependent Variable: log BM

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients	Std. Error	Standardized Coefficients	t	Sig.
1	(Constant)	5.365	.032		170.283	.000
	Rf	-1.350	.058	-.995	-23.416	.000

- a. Dependent Variable: log BM

Perhitungan BM pada sampel

a= 5.365; b= -1.350 ; r=-0.995

Jarak sampel	Rf sampel	Log y Da	Antilog Y BM Da	BM kDa sampel	BM kDa teori
22	0.333	4.915	82224.265	82.24	86
31	0.470	4.730	53703.180	53.70	55
38	0.576	4.587	38636.700	38.64	40

Lampiran 11: Analisis Regresi Karakterisasi Protein Permukaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan suhu inkubasi 42° C.

panjang gel = 71 mm

Jarak Marker	Rf	BM (y kDa)	BM (y Da)	Log BM y Da
6	0.085	200	200000	5.301
11	0.155	116.3	116300	5.066
22	0.31	97.4	97400	4.989
34	0.479	66.2	66200	4.821
54	0.761	31	31000	4.491
58	0.817	21.5	21500	4.332
63	0.887	14.4	14400	4.158

Regression

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf	.	Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: log BM

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.985	.970	.964	7.946E-02

- a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.025	1	1.025	162.366	.000
	Residual	3.157E-02	5	6.314E-03		
	Total	1.057	6			

- a. Predictors: (Constant), Rf
b. Dependent Variable: log BM

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients	Std. Error	Standardized Coefficients	t	Sig.
1	(Constant)	5.366	.058		92.893	.000
	Rf	-1.260	.099	-.985	-12.742	.000

- a. Dependent Variable: log BM

Perhitungan BM pada sampel

a= 5.366; b= -1.260; r= -0.995

Jarak sampel	Rf sampel	Log y Da	Antilog Y BM Da	BM kDa sampel	BM kDa teori
24	0.338	4.940	87096.359	87.10	86
34	0.479	4.763	57876.1988	57.88	55
43	0.606	4.603	40086.6717	40.09	40

Lampiran 12: Data Produksi Susu di Jawa Timur

SUMMARY WEEKLY MILK INTAKE AND QUALITY STATEMENT
 Week No: 3-35 From 01/09/03 to 07/09/03
 09/03

CODE	R.N. (kg)	AVERAGE	FAT %	SNF %	T.S.M	PROTY	LACTM	S.S.M	FREZZING POINT
01.	645,030	93,799	4,08	6,13	12,40	9,17	5,09	1,0000	009
02.	133,750	19,951	4,08	6,09	12,17	9,95	5,07	1,0000	000
03.	330,270	43,423	4,00	6,13	12,20	9,11	4,48	1,0000	000
04.	474,550	67,780	4,04	6,17	13,23	9,15	4,41	1,0000	000
05.	43,370	2,185	4,04	6,09	11,90	9,19	4,57	1,0000	000
06.	355,750	50,330	4,04	6,04	12,07	9,01	4,51	1,0000	000
07.	79,120	10,371	4,00	6,04	12,07	9,01	4,50	1,0000	000
08.	117,230	14,745	4,07	6,04	12,11	9,05	4,50	1,0000	000
09.	10,350	1,308	4,01	7,70	12,07	9,01	4,51	1,0000	000
10.	52,130	6,375	4,01	7,07	12,03	9,00	4,50	1,0000	000
11.	103,030	13,450	4,01	7,00	12,03	9,01	4,50	1,0000	000
12.	134,200	17,344	4,01	7,00	12,03	9,01	4,50	1,0000	000
13.	104,200	13,332	4,01	7,00	12,03	9,01	4,50	1,0000	000
14.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
15.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
16.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
17.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
18.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
19.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
20.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
21.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
22.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
23.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
24.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
25.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
26.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
27.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
28.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
29.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
30.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
31.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
32.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
33.	40,000	5,000	4,00	6,00	12,00	9,00	4,50	1,0000	000
TOTAL/O	5.573,150	810,951	4,15	6,12	12,20	9,11	4,41	1,0000	000