

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM WOUNDS OF DAIRY CATTLE IN VITRO

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI STAPHYLOCOCCUS AUREUS DARI LUKA KULIT SAPI PERAH SECARA IN VITRO.

Naimah Putri^{1*}, Eka Legya Frannita², Mochammad Charis Hidayatullah²

¹Department of Leather Processing Technology, Politeknik ATK Yogyakarta, 55188, Special Distric of Yogyakarta, Indonesia

²Department of Leather Product Processing Technology, Politeknik ATK Yogyakarta, 55188, Special Distric of Yogyakarta, Indonesia

* Corresponding author: naimah@atk.ac.id

Abstract:

The skin is the largest organ of the body that can be infection. One of the causes of infections is microorganisms. The presence of *Staphylococcus aureus* on the skin of dairy cattle can affect the quality of leather. This research was conducted to isolate and identify *S. aureus* from the skin of injured dairy cattle. The sample was taken from a dairy farm in Surabaya. Isolation of *S. aureus* was carried out using NA and MSA selective media, while characterization was carried out using gram staining, catalase test, and coagulase test. The research results showed that samples isolated from wounds on the skin of dairy contained *S. aureus*. Gram staining test showed gram positive bacteria with coccus morphology and clustered arrangement. The catalase test was positive with the formation of H₂O and O₂. Catalase test was indicated by the formation of coagulation or clots in the blood plasma. These results indicated that the skin with contains *S. aureus* bacteria which can cause infection so that it can affect the quality of the skin to be tanned.

Keyword: *staphylococcus aureus*, gram positif, katalase, koagulase

Intisari:

Kulit merupakan organ terbesar dari tubuh makhluk hidup yang dapat mengalami infeksi. Salah satu penyebab infeksi adalah mikroba. Keberadaan *Staphylococcus aureus* pada kulit sapi perah dapat memengaruhi kualitas kulit tersamak. Tujuan penelitian ini adalah untuk isolasi dan identifikasi *S. aureus* dari kulit sapi perah yang mengalami luka. Sampel dalam penelitian ini diambil dari peternakan sapi perah di Kota Surabaya. Isolasi *S. aureus* dilakukan menggunakan media NA dan media selektif MSA, sedangkan karakterisasinya menggunakan pewarnaan gram, uji katalase, dan uji koagulase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel yang diisolasi dari luka pada kulit sapi perah terdapat *Staphylococcus aureus*. Uji pewarnaan gram menunjukkan bakteri Gram positif dengan morfologi coccus dan susunan bergerombol. Uji katalase bersifat positif dengan terbentuknya air (H₂O) dan gelembung gas (O₂) dan uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya koagulasi atau penggumpalan pada plasma darah. Hasil ini menunjukkan bahwa pada kulit yang mengalami luka terdapat bakteri *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan infeksi sehingga dapat mempengaruhi kualitas kulit yang akan disamak.

Kata kunci: *staphylococcus aureus*, gram positif, katalase, koagulase

Pendahuluan

Kulit adalah media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme, terutama bakteri yang dapat menyebabkan kerusakan. Kerusakan pada kulit dapat menyebabkan morbiditas dan bahkan mortalitas yang signifikan [1]. Pada hewan ternak yang masih hidup, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba di kulit, seperti pH, keadaan permukaan kulit, deskuamasi lapisan epidermis, sekresi dan ekskresi dari kelenjar-kelenjar keringat pada lapisan dermis [2].

Penyakit infeksi pada kulit hewan yang luka sering kali terjadi namun diabaikan. Luka infeksi yang tidak ditangani dengan baik mempermudah terjadinya infeksi sekunder sehingga dapat memperparah luka tersebut. Beberapa bakteri dikenal sebagai flora normal alami kulit yang memiliki potensi menyebabkan penyakit, contohnya *S. aureus* [3]. Bakteri ini dapat berubah menjadi patogen dan memiliki kemampuan untuk menyebabkan infeksi pada kondisi tubuh yang terdapat luka. *S. aureus* sering ditemukan pada luka supuratif pada manusia dan hewan yang menyebabkan infeksi pada luka tersebut termasuk luka pasca operasi [5]. Menurut Kopecki *et al* dan Trostrup *et al*, *S. aureus* dapat ditemukan pada luka kronis kulit [6].

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif dengan morfologi bulat (coccus), susunan seperti buah anggur dengan ukuran diameter 0,8-1 μm . Sifat dari bakteri ini adalah non motil dan tidak memiliki spora [8]. *S. aureus* sering menjadi penyebab infeksi sekunder pada beberapa penyakit kulit termasuk diantaranya penyakit eksim yang pada awalnya merupakan penyakit alergi, namun seringkali menjadi parah akibat infeksi sekunder dari *S. aureus*.

Luka pada kulit hewan dapat mempengaruhi dan menentukan kualitas dari kulit tersamaknya. Kulit tersamak yang bermutu baik tidak mungkin dibuat dari kulit mentah yang bermutu rendah seperti terdapat luka mekanik atau luka yang disebabkan oleh mikroorganisme termasuk bakteri. Sifat fisik kulit mentah dipengaruhi oleh keadaan ternak sewaktu masih hidup dan sifat-sifat tersebut dibawa pula setelah kulit mengalami pengawetan dan penyamakan [9].

Kulit dapat berperan serta sebagai media tempat berkembangbiak bagi mikroba-mikroba [10], termasuk mikroba patogen sehingga tidak menutup kemungkinan dapat menimbulkan penyakit bagi manusia seperti karyawan perusahaan.

Berdasarkan permasalahan di atas, tujuan penelitian ini yaitu mengisolasi dan identifikasi bakteri yang terdapat pada luka kulit hewan ternak. Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai bakteri yang terdapat pada luka kulit hewan sehingga mempengaruhi kualitas kulit yang akan disamak.

Metode Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, rak tabung, pembakar bunsen, ose, tabung Erlenmeyer, gelas obyek, autoclave, vortex, mikroskop, inkubator, dan pipet. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* isolat lapang yang berasal dari swab kulit sapi yang terdapat luka di peternakan sapi perah. Pengambilan sampel dilakukan secara proporsional sesuai ketersediaan sampel di peternakan.

Sterilisasi Peralatan Penelitian

Sebelum penelitian dilaksanakan, seluruh peralatan yang akan digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121^oC, pada tekanan uap 15 pound / inci², selama 15 menit.

Pembuatan Media

Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*)

Media NA dibuat dengan cara melarutkan 4,2g media NA ke dalam 150mL aquadest steril menggunakan erlenmeyer. Larutan ini selanjutnya dipanaskan di atas kompor listrik sambil diaduk-aduk selama 7-10 menit. Setelah larutan homogen, disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

Media MSA dibuat dengan cara menimbang media MSA sebanyak 5,55g, lalu menambahkan 50mL aquadest steril ke dalam erlenmeyer. Larutan ini selanjutnya dipanaskan di atas kompor listrik sambil diaduk-aduk selama 10 menit. Setelah larutan homogen, disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan yang telah steril dituang ke dalam *petri dish* steril ± 15mL, dan dibiarkan sampai dingin selanjutnya siap untuk digunakan.

Isolasi bakteri

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah swab pada luka kulit sapi perah. Pengambilan sampel menggunakan *swab* steril, kemudian swab dicelupkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *nutrient broth* (NB). Tabung yang berisi NB dimasukkan ke dalam termos yang berisi es. Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil suspensi bakteri dari biakan NB, kemudian digoreskan pada media MSA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dipilih koloni yang terpisah berbentuk bulat, cembung, pinggiran rata, dan berwarna keemasan. Selanjutnya, koloni terpisah pada MSA dipindahkan ke tabung NA miring lalu diinkubasi selama 37°C selama 24 jam. Koloni yang telah diamati secara mikroskopis digunakan uji katalase dan koagulase.

Identifikasi bakteri

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui morfologi dan sifat Gram bakteri. Pewarnaan Gram dilakukan dengan mencampurkan satu ose biakan bakteri dari MSA dengan NaCl fisiologis yang telah diteteskan pada *object glass*, dikeringkan, dan difiksasi di atas spiritus. Preparat ditetesi dengan zat warna kristal violet selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir, ditetesi lugol setelah itu biarkan selama 1 menit, dan dilunturkan dengan alkohol 95% selama 10 detik. Selanjutnya alkohol dicuci dengan air dan diberi zat warna safranin selama 2 menit, preparat dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1000x. Morfologi *S. aureus* akan tampak bulat atau coccus seperti buah anggur dan berwarna ungu karena menyerap zat pewarna kristal violet.

b. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menambahkan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3% pada koloni bakteri di atas *object glass*. Suspensi dicampur secara perlahan menggunakan ose, hasil uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara.

c. Uji Koagulase

Uji koagulase dilakukan dengan metode uji tabung dengan cara 200µL plasma darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni bakteri ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur secara perlahan. Selanjutnya, tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reaksi koagulase positif dapat dilihat dengan terbentuknya *clot* atau *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri

Sampel swab pada kulit yang mengalami luka ditanam pada media NA dan dilanjutkan dengan media selektif MSA dengan cara *streak* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pertumbuhan menunjukkan terbentuknya koloni dan perubahan warna pada media MSA karena terjadinya fermentasi terhadap manitol. Koloni bakteri berbentuk bulat, mengkilat, berwarna kuning dan media MSA berubah warna dari merah menjadi kuning. Bakteri yang tidak mampu memfermentasi *mannitol* tampak zona berwarna merah atau merah muda [11]. Zona kuning menunjukkan adanya fermentasi *mannitol*, yaitu asam yang dihasilkan menyebabkan perubahan *phenol red* pada agar yang berubah dari merah menjadi berwarna kuning [12].

Identifikasi Bakteri

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat *S. aureus* pada kulit sapi perah yang mengalami luka. Berdasarkan hasil uji dapat diketahui bahwa bakteri yang diidentifikasi adalah *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi bakteri *S. aureus* pada luka kulit sapi

Uji	Hasil Uji
MSA	+
Pewarnaan Gram	Gram positif
Katalase	+
Koagulase	+

Sumber: Hasil analisis.

Pemeriksaan makroskopis untuk menentukan koloni bakteri *S. aureus* dilakukan dengan isolasi pada media MSA. Media ini sering digunakan untuk mengisolasi bakteri *Staphylococcus* patogen, khususnya *S. aureus*, karena tidak dapat bertahan dengan kondisi tersebut. Kandungan sodium klorida yang tinggi pada media MSA membuat media ini lebih selektif terhadap *S. aureus*. Pertumbuhan bakteri pada media selektif *Mannitol Salt Agar* dengan koloni berwarna kuning (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *S. aureus* yang mampu memfermentasi manitol sehingga mengubah warna media dari merah menjadi kuning. Hasil penelitian Dewi [13] menunjukkan *S. aureus* yang berasal dari sampel susu kambing yang mengalami infeksi mastitis memiliki kemampuan memfermentasi manitol.

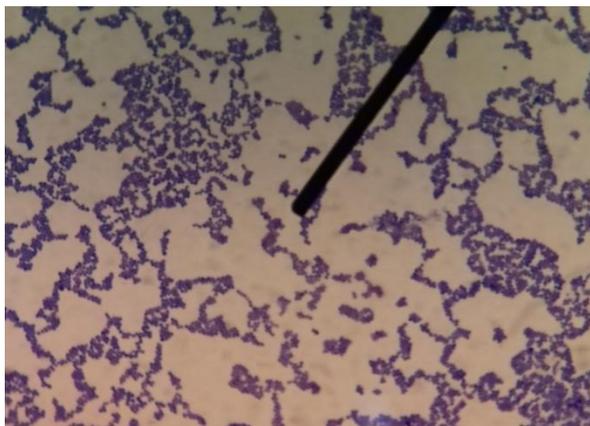


Gambar 1. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media MSA

Sumber. Hasil analisis

Pemeriksaan mikroskopis dengan uji pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri Gram positif berbentuk *coccus*. Pada gambar 2 menunjukkan hasil pewarnaan Gram berupa bakteri berwarna ungu dengan morfologi *coccus* bergerombol terlihat seperti buah anggur. Warna ungu disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama, yaitu kristal violet. Perbedaan sifat Gram dipengaruhi oleh kandungan pada dinding sel, yaitu bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang lebih tebal jika dibanding dengan

Gram negatif [14]. Identifikasi *S. aureus* yang berasal dari susu kambing yang mengalami infeksi mastitis subklinis di Banyuwangi menunjukkan bakteri berwarna ungu atau violet [15].



Gambar 2. Uji Pewarnaan Gram
Gram positif, bentuk coccus, berkelompok seperti buah anggur
Sumber. Hasil analisis

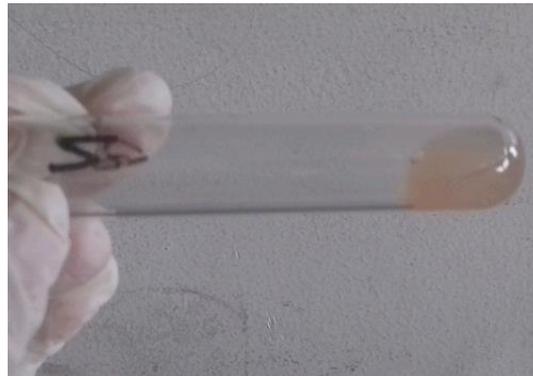
Identifikasi bakteri selanjutnya adalah uji-uji biokimia untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim katalase dan koagulase. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim katalase. *S. aureus* bersifat katalase positif yang mampu menghidrolisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan gelembung gas (O_2). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Kitai [16]; Todar [17]; Yurdakul *et al* [18]. Gambar 3 menunjukkan hasil uji katalase positif dengan terbentuknya gelembung gas akibat terbentuknya enzim katalase oleh *S. aureus* setelah ditambahkan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) 3%.



Gambar 3. Uji Katalase (Sumber. Hasil analisis)

Uji biokimia lain yang sangat penting dalam identifikasi *S. aureus* adalah uji koagulase. Uji koagulase dilakukan untuk membedakan spesies *S. aureus* dengan *Staphylococcus* yang lain, atau dengan genus *Micrococcus* [19]. Menurut McAdow *et al.*, peran koagulase yang dihasilkan oleh bakteri digunakan sebagai penentu spesies *Staphylococcus aureus*, karena bakteri ini mengandung koagulase yang dapat menggumpalkan plasma darah [20]. Enzim koagulase hanya mampu dihasilkan oleh *S. aureus*. Kerja dari enzim koagulase adalah mengubah fibrinogen menjadi fibrin sehingga dapat menyebabkan plasma darah menggumpal. *Staphylococcus aureus* dapat mengaglutinasi plasma darah, karena mempunyai *coagulase reacting factor*. Kemampuan

mengagglutinasi plasma merupakan salah satu faktor virulensi dalam pathogenesis *S. aureus* (l. Ote, Gambar 4 menunjukkan uji koagulase positif yang ditandai dengan terbentuknya koagulasi atau penggumpalan pada plasma darah kelinci yang telah ditambahkan koloni bakteri [21].



Gambar 4. Uji Koagulase (Sumber. Hasil analisis)

Kesimpulan

Isolat bakteri yang berasal dari swab pada kulit sapi perah yang mengalami luka adalah *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan pertumbuhan bakteri pada media selektif MSA, dapat memfermentasi mannitol, uji pewarnaan Gram positif berbentuk coccus, uji katalase menghasilkan H₂O dan O₂ serta uji koagulase positif. Bakteri yang terdapat pada luka kulit hewan dapat mempengaruhi kualitas kulit yang akan disamak. Penelitian secara *invivo* diperlukan untuk mengetahui karakteristik bakteri *Staphylococcus aureus* lebih lanjut.

Daftar Pustaka

- [1]. P. Rathee, H. Chaundary, S. Rathee, D. Rathee, V. Kumar, and K. Kohli, "Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review," *Inflamm Allergy Drug Targets*, Vol. 3, No. 3, pp. 229-235, doi: 10.2174/187152809788681029.
- [2]. E. L. Biberstein, and Y. C. Zee," Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Scientific Publication Inc. Boston. p. 612-615, (1990).
- [3]. Z. A. Kanafi, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: new challenges from an old pathogen," *Enferm Infecc Microbiol Clin*, Vol. 24, No. 3, pp. 182-193, 2006, doi: 10.1157/13086552.
- [4]. A. Thakur, S. Malholtra, S. K. Malholtra, and S. Malholtra," Bacteriological profile in atopic dermatitis: comparison between normal and lesional skin," *Journal of Pakistan Association of Dermatologist*, Vol. 23, No. 4, pp. 360-364, 2013.
- [5]. Darmawi, A. F. Zahra, M. N. Salim, M. Dewi, M. Abrar, Syafruddin, M. Adam, "Isolation, identification and sensitivity test of Staphylococcus aureus on postsurgery wound of local dogs (*Canis familiaris*)," *Jurnal Medika Veterinaria*. Vol. 13, No. 1, pp. 37-46, 2019, doi: 10.21157/j.med.vet.v1 1i1.4122.
- [6]. Z. Kopecki, D. Ogunniyi, D. J. Trott, and A. J. Cowin," Fighting chronic wound infection-one model at a time," *Wound Pract Res*, Vol. 25, No. 1, pp. 6-13, 2017.

- [7]. H. Trostrup, K. Thomsen, H. P. Calum, N. Hoiby, and C. E. Moser, "Animal models of chronic wound care," *Chronic Wound Care Manage. Res*, Vol. 3, pp. 123-132, 2016, doi: 10.2147/CWCMR.S84361.
- [8]. E. R. S. Iman, R. Ratnasari, H.E. Narumi, Suryanie, W. Tyaningsih, dan S. Chusniati. *Mikrobiologi Veteriner 1*. Airlangga University Press. Surabaya. p.178-183 (2011).
- [9]. S. Triatmojo, dan Zainal. *Penyamakan Kulit Ramah Lingkungan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. p. 15 (2014).
- [10]. M. Sharif, and F. Zainal, "Hand sanitizers: efficiency against microbes from currency notes and coins in local circulation," *Pakistan J Mol Med*, Vol. 2, No. 2, pp. 75-83, 2015.
- [11]. R. I. Boyd, and J.J. Morr. 1984. *Medical Microbiology*. Little Brown and Company Boston. United States of America. p. 34-37. (1984).
- [12]. T. X. Austin, *Manitol Salt Agar*. Austin Community College District. http://www.austin.edu/microbugz/html/mannitol_salt_agar.html, 2010. [5 September 2022].
- [13] A. K. Dewi, "Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap amoxicillin dari sampel susu kambing Peranakan etawa (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulon Prog, Yogyakarta," *Jurnal Sain Veteriner*, Vol. 31, No. 2, pp. 138-150, 2013.
- [14]. L. N. Hayati, W. Tyasningsih, R. N. Praja, S. Chusniati, M. N. Yunita, P. A. Wibawati, "Isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus* pada susu kambing Peranakan etawah penderita mastitis subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi," *Jurnal Medik Veteriner*, Vol. 2, No. 2, pp. 76-82. Doi: 10.20473/jmv.vol2.iss2.2019.76-82.
- [15]. T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, "The Bacterial Cell Envelope," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 2, No. 5, pp. 1-16, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [16]. S. Kitai, A. Shimizu, J. Kawano, E. Sato, C. Nakano, H. Kitawaga, K. Fujio, K. Matsumura, R. Yasuda, and T. Inamoto, "Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Enterotoxigenic Staphylococcus aureus* in Retail raw chicken Meat Throughout Japan," *Veterinary Medicine Science*, Vol.67, No.3, pp. 269-274, 2005, doi: 10.1292/jvms.67.269.
- [17]. K. Todar, "Todar's Online Textbook of Bacteriology, *Staphylococcus*", 2005. [28 September 2022].
- [18]. N. E. Yurdakul, Z. Erginkaya, and E. Unal, "Antibiotic Resistance of *Enterococci*, *Coagulase Negative Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Chicken Meat," *Czech J. Food Science*, Vol. 31, No. 1, pp. 14-19, 2013.
- [19]. F. D. Lowy, "Staphylococcus aureus infections," *N Engl J Med*, Vol.339, No. 8, 1998, doi: 10.1056/NEJM199808203390806.
- [20]. M. McAdow, D. M. Missiakas, and O. Schneewind, "Staphylococcus aureus secretes coagulase and von willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections," *J Innate Immun*, Vol.4, No.2, pp. 141-148, 2012, doi: 10.1159/000333447.
- [21]. I. Ote, B. Taminiau, J.N. Duprez, I. Dizier, and J.G. Mainil, "Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis," *Vet Microbiol*, Vol. 153, No.3-4, pp. 285-292, 2011, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.042.