

Deteksi Resistensi Antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat Asal Sapi Perah dan Hewan Kesayangan di Yogyakarta dan Jawa Tengah Indonesia

Antibiotic Resistance Detection of Staphylococcus aureus Isolated from Dairy Cattle and Pet Animals in Yogyakarta and Central Java Indonesia

Alyaa Rifqoh Putri Yosyana¹, Siti Isrina Oktavia Salasia^{1*}, Madarina Wasissa¹,
Ghias Ghifari Alhadz¹, Fatkhanuddin Aziz²

¹Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*Corresponding author, Email: isrinasalasia@ugm.ac.id

Naskah diterima: 26 September 2024, direvisi: 18 Desember 2024, disetujui: 21 Desember 2024

Abstract

Antibiotics play a significant role in controlling bacterial infection, however, will no longer be effective because of antimicrobial resistance (AMR). *Staphylococcus aureus* has become resistant to various antibiotics, so detecting and analyzing genes encoding antibiotic resistance traits is important. This research aims to identify phenotypically, antibiotic sensitivity, and detect antibiotic-resistant genes in *S. aureus* isolated from dairy cattle and pet animals. Samples from dairy farms in Boyolali total of 30 samples and 62 samples of pet animals in Yogyakarta and Semarang were used. Phenotypic and genotypic identification results based on 23S rRNA and *nuc* genes showed 80% (24/30) dairy milk samples and 19,35% (12/62) pet animal samples were *S. aureus* positive. Based on antibiotic susceptibility test, dairy milk *S. aureus* isolates are resistant to penicillin G (50%), oxacillin (25%), tetracycline (21%), ampicillin (17%), gentamicin, cefoxitin, and amoxicillin (13%), clindamycin (4%), and still sensitive to erythromycin (100%). Pet animal *S. aureus* isolates showed resistance to oxacillin and erythromycin (16,67%), tetracycline, penicillin G, and clindamycin (8,33%), but still sensitive to gentamicin, ampicillin, cefoxitin, and ciprofloxacin and amoxicillin (100%). These results showed *S. aureus* dairy milk and pet animal isolates phenotypically have resistance almost 50% to various antibiotics but are still sensitive to erythromycin. The result of this research indicated there are majority of multidrug-resistant *S. aureus* strains in dairy milk and pet animals threaten public health. These results can be used as a basic strategy for controlling and preventing multidrug resistance in *S. aureus*.

Keywords: antibiotic; dairy cattle; multidrug resistance; pet animal; *staphylococcus aureus*.

Abstrak

Antibiotik berperan penting menangani infeksi bakterial, namun terancam tidak efektif karena fenomena *antimicrobial resistance* (AMR). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fenotipik, mengetahui sensitivitas antibiotik, serta mendeteksi gen resistensi antibiotik *S. aureus* asal sapi perah dan hewan kesayangan. Sampel susu berjumlah 30 dari peternakan sapi perah di Boyolali dan 62 sampel asal hewan kesayangan di Yogyakarta dan Semarang digunakan dalam penelitian ini. Hasil identifikasi fenotipik serta genotipik pada gen 23S rRNA dan *nuc* diketahui sebanyak 80% (24/30) sampel asal susu sapi perah dan 19,35% (12/62) sampel asal hewan kesayangan positif teridentifikasi *S. aureus*. Berdasar uji sensitivitas antibiotik diketahui bahwa isolat *S. aureus* asal susu sapi perah telah resisten terhadap penisilin G (50%), oksasilin (25%), tetrasiklin (21%), ampisilin (17%), gentamisin, cefoxitin, dan amoksisilin (13%), klindamisin (4%), dan masih sensitif terhadap eritromisin (100%). Isolat *S. aureus* asal hewan kesayangan telah resisten terhadap oksasilin dan eritromisin (16,67%), tetrasiklin, penisilin G, dan klindamisin (8,33%), namun masih

sensitif terhadap gentamisin, ampicilin, cefoxitin, siprofloksasin, dan amoksisilin (100%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan hewan kesayangan secara fenotipik telah resistensi hampir 50% terhadap berbagai antibiotik namun masih cukup sensitif terhadap eritromisin. Hasil penelitian ini mengindikasikan adanya mayoritas strain *multidrug resistant S. aureus* yang terdapat pada susu sapi perah dan hewan kesayangan yang membahayakan bagi kesehatan masyarakat. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar strategi pengendalian dan kontrol *multidrug resistant S. aureus*.

Kata kunci: antibiotik; hewan kesayangan; *multidrug resistance*; sapi perah; *staphylococcus aureus*.

Pendahuluan

Antibiotik berperan penting dalam melindungi kesehatan manusia dan hewan serta telah efektif dalam mengobati dan mencegah berbagai penyakit infeksius. Namun beberapa antibiotik telah dilaporkan sudah tidak efektif lagi dikarenakan mikroorganisme telah resisten. Laporan dari WHO tahun 2021 menunjukkan bahwa peningkatan *antimicrobial resistance* (AMR) pada patogen manusia dan hewan menjadi ancaman terbesar terhadap kesehatan global. Sekitar 4,95 juta kematian pada tahun 2019 berhubungan dengan AMR (Murray *et al.*, 2022). Para ahli memprediksi pada tahun 2050 terdapat 10 juta kematian secara global per tahun akibat AMR (O'Neill, 2016).

Bakteri strain *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) telah menyebar di seluruh dunia dan Asia menjadi daerah dengan prevalensi paling tinggi (Lee *et al.*, 2018). Prevalensi infeksi MRSA pada manusia di Asia mencapai 70%, di Indonesia tepatnya di Jawa dan Bali prevalensinya mencapai 3,1% (Santosaningsih *et al.*, 2018). Infeksi MRSA pada anjing di Bangladesh memiliki prevalensi 8,7% serta di Malaysia prevalensi infeksi MRSA di kucing sebanyak 2% (Rana *et al.*, 2021; Afshar *et al.*, 2023). Prevalensi infeksi MRSA pada hewan di Perancis pada anjing 29,3%, kucing 26,5%, dan kuda 47,1% (Haenni *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Bierowiec *et al.* (2016) menyebutkan bahwa prevalensi strain *S. aureus* pada kucing peliharaan yang resisten terhadap penisilin 58,33%, oksasilin 8,33%, gentamisin 4,17%, eritromisin 4,17%, dan tetrasiklin 4,17%.

Adanya penularan MRSA dari hewan ke manusia maupun sebaliknya telah dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Sahibzada *et al.* (2017) di Australia dimana 76% babi terinfeksi MRSA dan 60% pekerja di peternakan

babi tersebut juga terisolasi MRSA. Susu merupakan sumber transmisi bakteri resisten antibiotik terutama MRSA dikarenakan adanya peningkatan penggunaan antibiotik di dunia kesehatan hewan dan peternakan sebagai agen terapi dan *growth promoter*. Asia tepatnya di Tiongkok, India, dan Iran prevalensi MRSA pada susu secara berturut-turut yaitu 12,1%, 9,6%, dan 16,2% (Titouche *et al.*, 2022). Widianingrum *et al.* (2016) telah melakukan penelitian tentang resistensi antibiotik pada *S. aureus* asal sapi perah di Jawa Tengah dan Riau, hasilnya yaitu sebanyak 80% isolat resisten ampicilin, 30% isolat resisten gentamisin, 50% isolat resisten oksasilin, 40% isolat resisten tetrasiklin, dan 40% isolat resisten eritromisin.

Peningkatan prevalensi resistensi antibiotik terutama *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) mengancam kesehatan dikarenakan pilihan pengobatan akan berkurang ketika patogen menjadi resisten terhadap antibiotik. *World Health Organization* pada tahun 2015 menyusun *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance* yang meminta setiap negara berupaya total untuk melawan resistensi antibiotik dengan meningkatkan pemahaman tentang AMR, memperkuat surveilans, mengurangi kejadian infeksi, mengoptimalkan penggunaan antibiotik, serta menjaga keberlanjutan investasi untuk melawan AMR (WHO, 2015). Informasi tentang prevalensi resistensi antibiotik menjadi penting dalam pengendalian AMR sebagai dasar dalam penanggulangannya secara praktik di lapangan. Penelitian resistensi antibiotik yang bersifat *emerging* dan *re-emerging* melalui analisis deteksi resistensi antibiotik terutama *S. aureus*, menjadi penting untuk mencapai tujuan pemahaman tentang AMR serta usaha pencegahan dan pengendalian bakteri resisten antibiotik dapat dilakukan.

Materi dan Metode

Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan 30 sampel susu sapi perah dan 62 sampel swab klinis asal hewan kesayangan yang terdiri dari 18 sampel asal anjing, 41 sampel asal kucing, dan 3 sampel asal kelinci. Sampel susu diambil dari peternakan sapi perah rakyat di Kecamatan Mojosongo, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Sampel swab klinis hewan kesayangan merupakan sampel swab lesi kulit, nasal, orofaring, dan/atau telinga yang diambil dari anjing, kucing, dan kelinci yang terindikasi secara klinis infeksi bakterial seperti pasien yang menunjukkan gejala atau adanya lesi pyogenik, *rhinitis*, demam, dan *lethargy*. Sampel swab klinis hewan kesayangan didapatkan dari Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi serta beberapa klinik hewan di Yogyakarta dan Semarang. Penggunaan sampel swab klinis hewan kesayangan untuk penelitian dibawah tanggung jawab dokter hewan di rumah sakit dan klinik hewan tersebut. Sampel diuji di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Isolasi dan Identifikasi Fenotipik *Staphylococcus aureus*

Seluruh sampel dilakukan isolasi *S. aureus* dengan cara melakukan *streak* pada plat agar darah dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni dilihat dari morfologinya dan dicocokkan dengan morfologi koloni *S. aureus* yaitu berbentuk bulat, *smooth*, *raised*, mengkilat (*glistening*), serta berwarna abu hingga kuning emas gelap (Carroll *et al.*, 2015; Fitrandi *et al.*, 2023). Koloni yang sesuai dengan koloni *S. aureus* selanjutnya diteguhkan dengan melakukan pewarnaan Gram. Bakteri *S. aureus* pada pewarnaan Gram menunjukkan Gram-positif dengan bentuk *coccus* dan mengelompok seperti bentuk anggur. Koloni bakteri yang morfologi koloni dan selnya sesuai dengan *S. aureus* dibuat biak murni selanjutnya sampel diidentifikasi secara fenotipik melalui rangkaian uji biokemis yaitu inokulasi bakteri pada media *mannitol salt agar* untuk melihat kemampuan memfermentasi manitol, lalu dilakukan uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes H₂O₂ 3%

pada objek glass dan mencampurkannya dengan 3-4 koloni bakteri. Hasil positif katalase menunjukkan adanya gelembung. Uji koagulase dilakukan dengan menginokulasikan 3-4 koloni bakteri pada tabung reaksi berisi 500 µL plasma kelinci dan diinkubasi pada 37°C lalu diamati setelah 4 dan 24 jam. Hasil positif koagulase menunjukkan terbentuknya jendalan pada dasar tabung.

Identifikasi Molekuler *Staphylococcus aureus*

Ekstraksi DNA pada sampel menggunakan kit Geneaid *Bacteria DNA* (Geneaid, Taiwan). Biakan tiap isolat bakteri dalam media *tryptic soy broth* dilakukan ekstraksi DNA sesuai dengan protokol dari produsen kit ekstraksi. Gen spesifik spesies dan sifat resistensi *S. aureus* dideteksi menggunakan PCR dengan mengamplifikasi DNA menggunakan primer spesifik. Identifikasi spesies secara molekuler menggunakan primer dengan target gen 23S rRNA dan *nuc*, serta identifikasi karakternya dengan mendeteksi target gen *coa*. Campuran untuk PCR sebanyak 10 µl terdiri dari 0,5 µl primer *forward* (10 pmol), 0,5 µl primer *reverse* (10 pmol), 5 µl PCR mix, 3,5 µl ddH₂O *molecular grade*, dan 0,5 µl sampel DNA. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi beberapa detik lalu dimasukkan kedalam *thermal cycler* dengan program PCR sesuai dengan literatur. Hasil amplifikasi kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis dengan 1,5% gel agarose dan *Safe-Red™ Gel Stain*. Langkah berikutnya yaitu divisualisasi dengan UV *transilluminator* lalu dibandingkan dengan kontrol dan marker 100 bp DNA *ladder*.

Uji Sensitivitas Antibiotik

Seluruh isolat *S. aureus* diinokulasikan ke media *tryptic soy broth* dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kultur kemudian dicuci menggunakan PBS steril dan dilarutkan dengan PBS steril sampai mencapai kekeruhan setara dengan standar 0,5 McFarland. Uji sensitivitas dilakukan menggunakan metode *disc diffusion Kirby-Bauer*. Biakan *S. aureus* yang telah distandarkan dengan 0,5 McFarland diambil 50 µl kemudian ditanamkan pada media *mueller hinton agar* (MHA) dengan metode *spread plate* menggunakan *glass spreader*. Disk antibiotik

lalu diletakkan berjarak antar disk-nya pada media MHA tersebut dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Disk antibiotik yang digunakan pada penelitian ini yaitu cefoxitin 30 µg, vankomisin 30 µg, linkomisin 2 µg, gentamisin 10 µg, ampicilin 10 µg, oksasilin 5 µg, tetrasiklin 30 µg, klindamisin 10 µg, penisilin G 10 µg, eritromisin 15 µg, siprofloksasin 5 µg, dan amoksisilin 25 µg. Zona inhibisi yang dibentuk kemudian diukur dan diklasifikasikan menjadi resisten, intermediet, dan sensitif sesuai dengan standar dari Clinical and Laboratory Standards Institute 2017.

Hasil dan Pembahasan

Sampel hasil koleksi asal susu sapi perah dan swab klinis hewan kesayangan diisolasi pada media plat agar darah (PAD) untuk dipilih berdasarkan morfologi koloni terduga *S. aureus* kemudian dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui morfologi sel bakteri. Morfologi koloni bakteri yang dipilih yaitu koloni yang berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, serta memiliki *margin smooth* dan terdapat zona terang di sekitar pertumbuhan koloni. Hasil dari pewarnaan Gram koloni terpilih menunjukkan 24 sampel dari total 30 sampel susu sapi perah serta 12 sampel (5 sampel asal anjing, 5 sampel asal kucing, dan 2 sampel asal kelinci) dari total 62 sampel swab klinis hewan kesayangan menunjukkan golongan bakteri Gram positif dengan bentuk *cocci* dan bergerombol seperti anggur (*staphylococci*). Hasil isolasi pada plat agar darah juga menunjukkan terdapat beberapa isolat yang memiliki karakteristik sebagai *small colony variant* (SCV) yaitu memiliki bentuk koloni seperti *fried egg* atau berukuran kecil dan berwarna keabuan bahkan tidak berpigmen.

Hasil pertumbuhan koloni *S. aureus* varian SCV di media plat agar darah pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil uji pada media *mannitol salt agar* (MSA) menunjukkan 80% (24/30) isolat asal susu sapi perah mengubah warna media MSA menjadi kuning. Sebanyak 19,3% (12/62) isolat asal swab klinis hewan kesayangan menunjukkan hasil mengubah warna media MSA menjadi kuning diantaranya isolat asal anjing, kucing, dan kelinci berturut-turut yaitu 27,7% (5/18), 12,2% (5/41), dan 66,7% (2/3) isolat. Karakteristik hemolisis *S. aureus* asal susu sapi perah pada media plat agar darah menunjukkan 54,2% (13/24) bersifat γ -hemolisis, 25% (6/24) bersifat β -hemolisis, dan 20,8% (5/24) isolat bersifat α -hemolisis. Bakteri *S. aureus* asal swab klinis hewan kesayangan menunjukkan karakteristik pada media plat agar darah sebanyak 66,6% (8/12) bersifat γ -hemolisis dan 33,3% (4/12) bersifat β -hemolisis. Isolat asal anjing menunjukkan 80% (4/5) bersifat γ -hemolisis dan 20% (1/5) bersifat β -hemolisis. Isolat asal kucing menunjukkan hasil 60% (3/5) bersifat γ -hemolisis dan 40% (2/5) bersifat β -hemolisis. Hasil pada isolat asal kelinci menunjukkan masing-masing 50% (1/2) bersifat γ -hemolisis dan β -hemolisis. Hasil uji katalase pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah menunjukkan 83,3% (20/24) positif dan pada isolat asal swab klinis hewan kesayangan sebanyak 75% (9/12) isolat positif katalase. Isolat asal anjing, kucing, dan kelinci berturut-turut menunjukkan sebanyak 80% (4/5), 80% (4/5), dan 50% (1/2) positif katalase. Hasil uji koagulase isolat *S. aureus* asal sampel susu sapi perah menunjukkan 33,3% (8/24) isolat positif koagulase, sedangkan pada isolat asal swab



Gambar 1. Pertumbuhan koloni *S. aureus* varian *small colony variant* (SCV) isolat BYL3 0 (atas) serta *S. aureus* varian *wild type* isolat A17 (kiri) dan isolat BYL22 (kanan) pada media plat agar darah domba.

Tabel 2. Hasil uji fenotipik isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan hewan kesayangan.

Asal isolat	Jenis hewan	Uji fenotipik				
		PAD	Pewarnaan Gram	MSA	Katalase	Koagulase
Susu	Sapi perah	α (20,8%)	Gram +, <i>staphylococci</i>	Kuning	+ (83%)	+ (67%)
		β (25%)			–(17%)	–(33%)
		γ (54%)			–(17%)	–(33%)
Hewan Kesayangan	Anjing	β (20%)			+ (80%)	+ (60%)
		γ (80%)			–(20%)	–(40%)
	Kucing	β (40%)			+ (80%)	+ (20%)
		γ (60%)			–(20%)	–(80%)
	Kelinci	β (50%)			+ (50%)	+ (100%)
		γ (50%)			–(50%)	–(50%)

klis hewan kesayangan sebanyak 50% (6/12) isolat positif koagulase. Hasil positif pada isolat asal anjing, kucing, dan kelinci berturut-turut yaitu 60% (3/5), 20% (1/5), dan 100% (2/2). Hasil uji fenotipik seluruh isolat *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil identifikasi molekuler pada sampel susu sapi perah berdasarkan target gen 23S rRNA menunjukkan sebanyak 90% (27/30) positif gen 23S rRNA dan dari 29 sampel positif 23S rRNA sebanyak 82,75% (24/29) positif gen *nuc*. Amplifikasi gen *coa* pada sampel asal susu perah menghasilkan 95,8% (23/24) isolat teridentifikasi *S. aureus* koagulase positif. Sampel asal swab klinis hewan kesayangan pada anjing didapatkan hasil sebanyak 66,7% (12/18) positif gen 23S rRNA dan dari 12 sampel positif 23S rRNA sebanyak 41,7% (5/12) sampel positif gen *nuc*., serta 100% (5/5) isolat terdeteksi positif gen *coa*. Sampel asal kucing sebanyak 23,8% (10/42) sampel positif 23S rRNA, 50% (5/10) sampel positif gen *nuc*, serta 60% (3/5) isolat *S. aureus* positif gen *coa*. Sampel asal kelinci didapatkan hasil 66,7% (2/3) sampel positif

gen 23S rRNA, 100% (2/2) sampel positif gen *nuc* dan *coa*. Hasil identifikasi isolat *S. aureus* secara genotipik dapat dilihat pada Tabel 3.

Isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan hewan kesayangan dilakukan uji sensitivitas antibiotik menggunakan metode Kirby-Bauer *disc diffusion*. Disk antibiotik yang digunakan yaitu cefoxitin 30 µg, vankomisin 30 µg, linkomisin 2 µg, gentamisin 10 µg, ampicilin 10 µg, oksasilin 5 µg, tetrasiklin 30 µg, klindamisin 10 µg, penisilin G 10 µg, eritromisin 15 µg, siprofloksasin 5 µg, dan amoksisilin 25 µg. Menurut Clinical and Laboratory Standards Institute (2017), sensitivitas bakteri terhadap antibiotik vankomisin dan linkomisin tidak dapat dideteksi menggunakan metode *disc diffusion* sehingga pada penelitian ini hasil terhadap antibiotik vankomisin dan linkomisin tidak diinterpretasikan. Interpretasi diameter zona jernih yang dihasilkan (S: sensitif; I: intermediet; R: resisten) dibandingkan berdasarkan standar dari Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). Hasil sensitivitas isolat *S. aureus* asal susu sapi perah terhadap berbagai antibiotik diantaranya tetrasiklin (S: 79,2%; I: 0%; R: 20,8%), oksasilin (S: 75%, I: 0%, R: 25%), gentamisin (S: 79,2%, I: 8,3%. R: 12,5%),

Tabel 3. Hasil identifikasi isolat *S. aureus* asal sapi perah dan hewan kesayangan secara molekuler.

Asal sampel	Jenis hewan	Jumlah sampel	Jumlah positif 23S rRNA	Jumlah positif <i>nuc</i>	Jumlah positif <i>coa</i>
Susu	Sapi perah	30	27 (90%)	24 (88,9%)	23 (95,8%)
Hewan kesayangan	Anjing	18	12 (66,7%)	5 (41,7%)	5 (100%)
	Kucing	42	10 (23,8%)	5 (50%)	3 (60%)
	Kelinci	3	2 (66,7%)	2 (100%)	2 (100%)

eritromisin (S: 83,3%, I: 16,7%, R: 0%), ampicilin (S: 79,2%, I: 4,2%, R: 16,6%), penisilin G (S: 37,5%, I: 12,5%, R: 50%), cefoxitin (S: 87,5%, I: 0%, R: 12,5%), siprofloksasin (S: 91,7%, I: 4,2%, R: 4,2%), amoksisilin (S: 54,2%, I: 33,3%, R: 12,5%), dan klindamisin (S: 87,5%, I: 8,3%, R: 4,2%). Isolat *S. aureus* asal anjing menghasilkan sensitivitas terhadap berbagai antibiotik diantaranya tetrasiklin dan oksasilin (S: 80%, R: 20%), gentamisin, ampicilin, cefoxitin, ciprofloksasin, amoksisilin, dan klindamisin (S: 100%), serta eritromisin dan penisilin G (S: 80%, I: 20%). Isolat asal kucing menghasilkan sensitivitas antibiotik tetrasiklin, gentamisin, ampicilin, cefoxitin dan siprofloksasin (S: 100%), oksasilin, eritromisin, dan klindamisin (S: 80%, R: 20%), amoksisilin (S: 80%, I: 20%), serta penisilin G (S: 60%, I: 20%, R: 20%). Isolat asal kelinci hasil sensitivitas antibiotiknya yaitu tetrasiklin, oksasilin, gentamisin, ampicilin, penisilin G, cefoxitin, siprofloksasin, amoksisilin, dan klindamisin (S: 100%), serta eritromisin (S: 80%, R: 20%). Hasil uji sensitivitas antibiotik seluruh isolat *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 4.

Isolasi sampel susu sapi perah dan swab klinis hewan kesayangan pada penelitian ini dilakukan dengan metode *T-streak* pada media platagar darah. Morfologi koloni *Staphylococcus aureus* pada plat agar darah menurut Kamaruddin (2020) yaitu berukuran besar, sedang, atau kecil, berwarna putih kekuningan, *convex*, permukaan mengkilat dan pada strain infeksi biasanya menghasilkan zona hemolisis jernih disekitar koloni. Menurut von Eiff (2008), *S. aureus* memiliki varian yang memiliki ukuran koloni

yang kecil atau disebut dengan *small colony variants* (SCVs) *S. aureus*. Bakteri *S. aureus* SCV memiliki morfologi tidak berpigmen, non-hemolitik, dan berukuran 10x lebih kecil dibanding strain induk. Menurut Melter and Radojevic (2010), *S. aureus* SCV pada plat agar darah dapat berpigmen keabuan atau tidak berpigmen serta dapat memiliki bentukan koloni seperti “telur mata sapi/*fried egg*”. Ukuran yang lebih kecil pada varian SCV disebabkan oleh sifat *auxotroph* terhadap menadion, hemin, atau timidin. *Auxotroph* merupakan sifat suatu organisme yang membutuhkan suatu senyawa tertentu sebagai syarat untuk organisme tersebut bertumbuh. Ketika media disuplementasi oleh senyawa tersebut, SCV akan tumbuh secepat strain induk. Menadion dan hemin dibutuhkan untuk biosintesis komponen rantai transport elektron. Bakteri *S. aureus* membentuk SCV sebagai strategi untuk menghindari dari terapi antibiotik (von Eiff, 2008).

Pewarnaan Gram dilakukan untuk konfirmasi *S. aureus* berdasarkan morfologi sel bakteri dari pertumbuhan koloni pada plat agar darah. Menurut Leber (2016), *Staphylococcus aureus* bersifat Gram-positif, memiliki bentukan sel yang seragam dan berbentuk *cocci* yang mengelompok seperti anggur. Hal tersebut sesuai dengan seluruh hasil pewarnaan Gram pada seluruh isolat terduga *S. aureus* yang berasal dari sampel susu sapi perah dan swab klinis hewan kesayangan. Bakteri Gram-positif memiliki dinding sel yang tersusun dari

Tabel 4. Hasil uji sensitivitas antibiotik isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan hewan kesayangan.

Jenis hewan	Uji Sensitivitas Antibiotik									
	TE	OX	CN	E	AMP	P	FOX	CIP	AML	DA
Susu Sapi Perah (n= 24)	S: 79% I: 0% R: 21%	S: 75% I: 0% R: 25%	S: 79% I: 8% R: 13%	S: 83% I: 17% R: 0%	S: 79% I: 4% R: 17%	S: 38% I: 13% R: 50%	S: 88% I: 0% R: 13%	S: 92% I: 4% R: 4%	S: 79% I: 33% R: 13%	S: 88% I: 8% R: 4%
Anjing (n= 5)	S: 80% I: 0% R: 20%	S: 80% I: 0% R: 20%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 20% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 20% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%
Kucing (n= 5)	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 0% R: 20%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 0% R: 20%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 60% I: 20% R: 20%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 20% R: 0%	S: 80% I: 0% R: 20%
Kelinci (n= 2)	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 80% I: 0% R: 20%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%	S: 100% I: 0% R: 0%

Keterangan: TE: Tetrasiklin, OX: Oksasilin, CN: Gentamisin, E: Eritromisin, AMP: Ampicilin, P: Penisilin G, FOX: Cefoxitin, CIP: Siprofloksasin, AML: Amoksisilin, DA: Klindamisin, S: Sensitif, I: Intermediet, R: Resistensi.

peptidoglikan sebagai polimer primer dan asam teikoat sebagai polimer sekunder. Dinding sel *S. aureus* peptidoglikannya tersusun atas untaian linear berulang *N-acetyl-glucosamine-N-acetyl-muramic acid* yang membentuk *fiber* yang panjangnya sekitar 10-15 dimer. Fitur tersebut yang membentuk bentukan sel dan melindungi sel dari lingkungan luar. Dinding sel bakteri Gram-positif relatif lebih tebal, bersifat lebih kokoh dan kurang bersifat permeabel (Beveridge, 2000). *Crystal violet* sebagai *primary stain* pada proses pewarnaan Gram dapat dengan mudah menembus dinding sel hampir semua bakteri. Tahap kedua yaitu penggunaan *iodine* sebagai *mordant* akan berikatan dengan *crystal violet* sehingga membentuk kompleks *dye-iodine* yang membentuk kristal *dye* berukuran besar yang terperangkap didalam dinding sel bakteri Gram-positif yang tebal sehingga penambahan *decolorizer* memiliki efek yang minim. Sel bakteri Gram-positif akan terkena dampak yang minim dengan adanya *counterstain dye* yang berwarna merah sehingga sel bakteri Gram-positif tetap berwarna ungu (Moyes *et al.*, 2009).

Media MSA merupakan media selektif dan diferensial yang digunakan untuk mengisolasi *Staphylococcus* sp. Media MSA mengandung 7,5% NaCl sehingga menyeleksi bakteri yang dapat mentolerir garam konsentrasi tinggi (Shields and Tsang, 2016). Media MSA mengandung manitol dan ketika manitol terfermentasi maka asam akan dihasilkan. Asam akan mengubah indikator pH di media, yaitu *phenol red*, berubah warna dari merah muda menjadi kuning (Engelkirk and Duben-Engelkirk, 2008). Bakteri *S. aureus* akan memfermentasi manitol dan menghasilkan asam yang akan menurunkan pH sehingga membentuk area berwarna kuning di sekitar koloni (Shields and Tsang, 2016). Bakteri *S. aureus* strain SCV pada media *mannitol salt agar* (MSA) tidak atau sedikit mengubah warna media menjadi kuning (Von Eiff, 2008). Isolat yang mengubah warna media MSA menjadi kuning secara fenotipik terkonfirmasi sebagai *S. aureus*.

Karakteristik hemolisis pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah dan hewan kesayangan divisualisasikan dengan penanaman pada media plat agar darah domba 5%. Hemolisin merupakan faktor virulensi yang berperan pada

invasi bakterial dan untuk lolos dari respon sistem imun (Ariyanti *et al.*, 2011). Hemolisin akan membuat sel hospes rusak dengan membuat lubang pada dinding sel hospes yang berkontribusi pada patogenisitas *S. aureus* (Desouky *et al.*, 2014). Pada uji hemolisis di plat agar darah akan terbentuk β -hemolisis, α -hemolisis, dan γ -hemolisis. Sifat β -hemolisis ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar koloni karena adanya lisis secara penuh eritrosit pada media plat agar darah. Sifat α -hemolisis dicirikan dengan zona berwarna hijau kecoklatan di sekitar koloni karena isolat dapat mengurangi hemoglobin eritrosit menjadi methemoglobin yang ditandai dengan warna hijau kecoklatan. Sifat γ -hemolisis ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media (Almwafy *et al.*, 2020).

Sifat β -hemolisis, α -hemolisis, dan γ -hemolisis dikodekan berturut-turut oleh gen *hly*, *hla*, dan *hly*. Isolat *S. aureus* yang bersifat β -hemolisis bersifat lebih patogen karena memiliki aktivitas *sphingomyelin-specific* fosfolipase yang menyebabkan sel lisis (Desouky *et al.*, 2014). Terdapat isolat yang menghasilkan berbagai tipe hemolisin, kebanyakan alfa dan beta, namun ada juga kombinasi hemolisin seperti alfa+beta+delta dan beta+delta (Natasa *et al.*, 2014). Umur domba yang darahnya digunakan untuk membuat plat agar darah juga berpengaruh pada tipe hemolitik *S. aureus* yang dihasilkan. Plat agar darah yang mengandung darah domba tua dapat menyebabkan agar pada dasar plat menggelap sehingga sulit untuk dilakukan pengamatan hemolisisnya (Ariyanti *et al.*, 2011).

Uji katalase dilakukan pada isolat yang terkonfirmasi *S. aureus* berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, dan pertumbuhannya pada media MSA. Uji katalase digunakan untuk mendeteksi adanya enzim katalase pada bakteri. Enzim katalase berfungsi untuk menetralkan efek bakterisidal dari H_2O_2 . Katalase akan mempercepat pemecahan H_2O_2 menjadi air dan oksigen ($2H_2O_2 + \text{Katalase} \rightarrow 2H_2O + O_2$) sehingga akan membentuk gelembung pada reaksinya (Reiner, 2016). Kebanyakan *staphylococci* merupakan katalase positif dengan pengecualian *S. saccharolyticus* dan *S. aureus* subsp. *anaerobius* yang merupakan katalase negatif dan tumbuh lebih cepat di kondisi anaerob (Del'Alamo *et al.*, 2007).

Keberadaan strain *catalase-negative S. aureus* (CNSA) jarang dilaporkan namun sifat fenotipnya telah lama dikenal. Masih belum jelas apakah sedikitnya jumlah laporan dikarenakan kejadian yang sebenarnya atau jarang dilaporkan karena banyak laboratorium mikrobiologi rumah sakit yang tidak rutin melakukan uji katalase (Del'Alamo *et al.*, 2007). Kasus CNSA pada hewan pertama kali dilaporkan oleh Corrente *et al.* (2013) tepatnya yaitu MRSA yang tergolong koagulase negatif pada anjing. Produksi katalase merupakan faktor virulensi *S. aureus* namun peran sebenarnya masih perlu diteliti. Telah dilaporkan sebelumnya bahwa isolat katalase negatif bersifat kurang virulen daripada isolat katalase positif, namun laporan yang dibuat oleh Del'Alamo *et al.* (2007) menyatakan bahwa terdapat tiga pasien manusia yang meninggal dengan bakterimia CNSA. Pada penelitian yang dilakukan di hewan model mencit oleh Messina *et al.* (2002) juga menunjukkan strain CNSA memiliki tingkat virulensi yang serupa dengan *S. aureus* katalase positif. Enzim katalase *S. aureus* terdiri dari 4 subunit dikodekan oleh gen *katA*. Strain *S. aureus* katalase negatif menekan aktivitas katalase akibat adanya *punctate mutation* dan/atau delesi yang menyebabkan perubahan integritas dan fungsi dari gen *katA*. Pada strain 164/13a di laporan yang ditulis oleh Corrente *et al.* (2013), fenotipe katalase negatif ini berkaitan dengan adanya delesi sehingga menyebabkan *frame-shift* pada gen *katA*.

Uji koagulase dilakukan karena tujuannya menurut Katz (2016) yaitu untuk membedakan strain *S. aureus* dari *S. epidermidis* dan spesies koagulase negatif lainnya. Strain *S. aureus* kebanyakan dapat mengkoagulasi plasma yang diberi perlakuan EDTA pada *tube test* serta akan menghasilkan gumpalan sel pada *slide test* (Katz, 2016). Uji koagulase menggunakan metode *slide test* dapat memberikan hasil bias. Metode *slide test* dapat memberikan hasil positif palsu karena beberapa *coagulase negative staphylococci* (CoNS) manusia memproduksi *clumping factor* dan dapat diartikan positif palsu dengan metode *slide test* (Kateete *et al.*, 2010). Koagulase merupakan faktor virulensi dari *Staphylococci* dan bagi yang tidak memproduksinya maka tergolong kurang patogenik (Locatelli *et al.*, 2023). Protein koagulase akan berinteraksi

dengan fibrinogen dan prothrombin sehingga dapat menggumpalkan fibrinogen, plasma atau darah (McAdow *et al.*, 2012).

Bakteri *S. aureus* mensekresi dua protein yang berperan dalam koagulasi yaitu koagulase (dikodekan oleh gen *coa*) dan von Willebrand *factor binding protein* (dikodekan oleh gen *vwb*). Ketika ada delesi yang menargetkan salah satu dari gen *coa* atau *vwb* akan menghasilkan penurunan virulensi yang sedang, namun apabila adanya *double* mutasi pada *coa-vwb* akan menghasilkan pengurangan virulensi secara dramatis pada kemampuan untuk menyebabkan abses atau sepsis letal di mencit (McAdow *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan Phonimdaeng *et al.* (1990), Baddour *et al.* (1994), dan Moreillon *et al.* (1995) menunjukkan bahwa adanya delesi kromosomal gen *coa* tidak mempengaruhi virulensi *S. aureus* pada model mencit infeksi subkutan atau mastitis dan di model tikus endokarditis infeksi. Kebanyakan *S. aureus* varian SCV bersifat koagulase positif pada uji koagulase *tube test* hanya pada setelah inkubasi lebih dari 18 jam sehingga sering menunjukkan hasil negatif palsu (von Eiff, 2008). Hasil negatif palsu juga dapat disebabkan oleh adanya produksi staphylokinase oleh beberapa isolat *Staphylococcal* yang dapat melisis jendalan saat inkubasi yang terlalu lama serta adanya potensi kontaminan juga dapat berkontribusi pada hasil negatif palsu saat inkubasi yang terlalu lama. Ada beberapa strain *S. aureus* yang membutuhkan waktu inkubasi lebih lama untuk menghasilkan reaksi koagulase positif. Bakteri *S. aureus* yang bersifat koagulase negatif merupakan strain yang tidak umum (Rukumani *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus diidentifikasi dengan mendeteksi gen 23S rRNA dan *nuc* sehingga pada penelitian ini isolat yang teridentifikasi sebagai *S. aureus* asal susu sapi perah berjumlah 24 isolat, asal anjing dan kucing masing-masing berjumlah 5 isolat, serta asal kelinci berjumlah 2 isolat. Identifikasi secara molekuler gen *coa* juga dilakukan dalam penelitian ini untuk mengonfirmasi isolat *S. aureus*, menurut Veras *et al.* (2008) gen *coa* merupakan 100% spesifik untuk *S. aureus*. Hasilnya yaitu sebanyak 95,8% isolat *S. aureus* asal susu sapi perah positif gen *coa*. Isolat asal anjing, kucing, dan kelinci

positif gen *coa* berturut-turut sebanyak 100%, 60%, dan 100%.

Hasil deteksi gen *coa* dibandingkan dengan hasil uji koagulasi metode *tube test*. Ada beberapa isolat yang positif mengandung gen *coa* namun menunjukkan hasil negatif pada uji koagulasi, hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sunagar *et al.* (2013) dan Younis *et al.* (2018). Identifikasi koagulasi secara fenotipik saja bukanlah metode yang tepat sehingga perlu kombinasi antara metode fenotipik dan molekuler, namun identifikasi secara molekuler lebih akurat dibanding dengan uji fenotipik biokemis (Sunagar *et al.*, 2013). Metode *tube test* digunakan untuk mendeteksi *free coagulase* yang dikodekan oleh gen *coa* yang membantu pengubahan fibrinogen menjadi fibrin yang menyelubungi permukaan bakteri dan melindunginya dari fagositosis dan sistem pertahanan hospes lainnya. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Valmorbidia *et al.* (2022) juga menghasilkan isolat *S. aureus* yang positif gen *coa* namun hasilnya negatif pada uji fenotipik menggunakan metode *tube test*. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa ada beberapa isolat yang memiliki gen *coa* namun tidak mengekspresikannya. Younis *et al.* (2018) menyatakan bahwa gen *coa* tidak mengekspresikan sifat koagulasi secara *in vitro* karena gen *coa* telah termutasi.

Uji sensitivitas antibiotik dilakukan pada seluruh isolat *S. aureus* menggunakan metode Kirby-Bauer *disc diffusion*. Hasil uji sensitivitas antibiotik pada isolat asal susu sapi perah menunjukkan adanya multi-resisten terhadap berbagai antibiotik seperti tetrasiklin, oksasilin, gentamisin, ampicilin, penisilin G, cefoxitin, siprofloksasin, amoksisilin, klindamisin, dan eritromisin dengan rentang resistensi sekitar 4,2%-50%. Penelitian resistensi antibiotik pada susu sapi perah yang dilakukan di Pakistan oleh Lubna *et al.* (2023), persentase resistensi terhadap antibiotik oksasilin, gentamisin, tetrasiklin, siprofloksasin, penisilin, dan amoksisilin berturut-turut yaitu 100%, 9,09%, 72,72%, 0%, 100%, dan 0%. Hal tersebut sesuai dengan penelitian ini bahwa persentase resistensi terhadap antibiotik penisilin paling banyak dibanding antibiotik lainnya, namun persentase resistensi terhadap antibiotik tersebut

tidak sebesar hasil yang didapatkan oleh Lubna *et al.* (2023), hal ini dapat disebabkan oleh masih adanya *S. aureus* yang sensitif terhadap antibiotik tersebut di daerah pengambilan sampel yaitu di Kecamatan Mojosongo, Boyolali. Penelitian yang dilakukan oleh Sharma *et al.* (2011) menggunakan susu sapi perah di India, sebanyak 15% dan 25% isolat resisten terhadap eritromisin dan ampicilin. Hal tersebut berbeda dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan tidak ditemukannya resisten terhadap eritromisin pada isolat asal susu sapi perah. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh adanya perbedaan geografis pengambilan sampel serta intensitas pengobatan menggunakan antibiotik yang dilakukan pada peternakan tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Ceniti *et al.* (2017) pada susu ruminansia di Italia menunjukkan bahwa resistensi isolat *S. aureus* dari susu terhadap klindamisin yaitu 15,62%. Hasil tersebut jauh lebih besar dibanding dengan hasil penelitian ini yang hanya sebesar 4,2%.

Hasil uji sensitivitas antibiotik pada isolat asal anjing, kucing, dan kelinci menunjukkan adanya multi-resisten antibiotik namun persentasenya tidak sebanyak pada isolat asal susu sapi perah. Tingkat resistensi yang ditunjukkan pada isolat asal anjing, kucing, dan kelinci terhadap antibiotik tetrasiklin, oksasilin, penisilin G, amoksisilin, klindamisin, dan eritromisin sekitar 20%. Hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap gentamisin, ampicilin, cefoxitin, dan siprofloksasin menunjukkan 100% masih sensitif terhadap antibiotik tersebut. Laporan yang ditulis oleh Abdullahi *et al.* (2022) tentang resistensi antibiotik *S. aureus* asal hewan kesayangan, menyatakan bahwa *S. aureus* asal hewan kesayangan menunjukkan resistensi antimikrobia fenotipik terhadap ampicilin, tetrasiklin, eritromisin, cefoxitin, oksasilin, streptomisin, trimethoprim/sulfamethoxazole, siprofloksasin, cefoxitin, rifampisin, penisilin, kloramfenikol, dan neomisin. Perbedaan geografis serta sumber daya alam berpengaruh terhadap prevalensi tingkat resistensi serta jenis antibiotik yang resisten.

Kesamaan dari hasil uji sensitivitas antibiotik pada sampel asal susu sapi perah dan hewan kesayangan yaitu ditemukannya resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin, oksasilin,

penisilin G, amoksisilin, dan klindamisin. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wayne *et al.* (2011) berdasarkan analisis kasus secara retrospektif dari sampel resep antibiotik pada anjing di Inggris yang diambil secara random dari tahun 2008 hingga 2009 sekitar 17% resep terapi antibiotik dibuat untuk kasus yang terkonfirmasi adanya infeksi, 45% diduga adanya infeksi, dan 38% tidak ada bukti dokumentasi adanya infeksi. Amoksisilin-klavulanat merupakan antibiotik yang paling banyak diresepkan diikuti oleh cefazolin/cefaleksin, enrofloksasin, ampicilin/amoksisilin dan doksisisiklin. Doksisisiklin merupakan antibiotik yang paling banyak digunakan pada kasus tanpa bukti terdokumentasi adanya infeksi, sedangkan amoksisilin-klavulanat merupakan jenis antibiotik paling sering diresepkan pada kasus yang terkonfirmasi atau diduga adanya infeksi (Wayne *et al.*, 2011).

Penggunaan antibiotik pada sapi perah telah diteliti oleh Kuipers *et al.* (2016) yang dilakukan di 94 peternakan sapi perah di Belanda dari tahun 2005 hingga 2012 menunjukkan hasil bahwa amoksisilin-asam klavulanat, sefalosporin, penisilin, dan tetrasiklin merupakan golongan antibiotik yang paling banyak digunakan. Adanya keseragaman resisten terhadap antibiotik β -laktam (penisilin, oksasilin, ampicilin, cefoxitin) disebabkan antibiotik tersebut banyak digunakan untuk terapi infeksi kulit pada hewan kesayangan dan kejadian mastitis pada sapi perah. Kejadian tersebut menandakan bahwa isolat *S. aureus* tersebut termasuk kedalam *methicillin-resistant S. aureus* (MRSA) (Widianingrum *et al.*, 2016). Isolat resisten antibiotik dapat bertransmisi ke manusia lewat konsumsi susu dan kontak yang intens terhadap hewan kesayangan. Penggunaan antibiotik sebagai *growth promoter* di peternakan serta terapi antibiotik yang tidak tepat jenis dan dosis di klinik hewan, terutama jenis antibiotik yang sering digunakan pada manusia dan hewan perlu dihindari. Kondisi sanitasi dan *handling* sapi selama proses pemerahan harus ditingkatkan untuk mencegah transmisi. Multi-resisten muncul akibat adanya penggunaan antibiotik yang tidak tepat jenis dan dosis sehingga bakteri berkembang menjadi multi-resisten dan menyebabkan terapi tidak efektif (Widianingrum *et al.*, 2016).

Penelitian berkelanjutan perlu dilakukan untuk memantau perkembangan resistensi antibiotik pada produk pangan asal hewan terutama susu serta hewan kesayangan yang lebih luas lagi cakupan wilayah pengambilan sampelnya dan perlu juga untuk menguji sampel asal manusia sehingga dapat mengetahui penyebarannya dan resiko zoonosis. Adanya indikasi mayoritas strain *multidrug resistant S. aureus* yang terdapat pada susu sapi perah dan hewan kesayangan sehingga perlu mendapat perhatian yang serius karena memiliki potensi membahayakan kesehatan masyarakat serta dapat menyebar ke hewan lain.

Kesimpulan

Berdasar hasil identifikasi fenotipik 30 sampel susu sapi perah dan 62 sampel swab klinis asal hewan kesayangan dapat dideteksi *S. aureus* pada 80% (24/30) sampel asal susu sapi perah dan 19,35% (12/62) sampel swab klinis asal hewan kesayangan. Hasil uji sensitivitas antibiotik menunjukkan isolat *S. aureus* asal susu sapi perah telah resisten terhadap tetrasiklin 21% (5/24), oksasilin 25% (6/24), gentamisin 13% (3/24), ampicilin 17% (4/24), penisilin G 50% (12/24), cefoxitin 13% (3/24), siprofloksasin 4% (1/24), amoksisilin 13% (3/24), klindamisin 4% (1/24), namun masih sensitif eritromisin 83%. *S. aureus* asal hewan kesayangan telah resisten terhadap tetrasiklin, penisilin G, dan klindamisin 8,33% (1/12), eritromisin dan oksasilin 16,67% (2/12), namun masih sensitif terhadap gentamisin, ampicilin, cefoxitin, siprofloksasin, dan amoksisilin 100%. Hasil tersebut menandakan adanya strain *multidrug resistant S. aureus* pada susu sapi perah dan hewan kesayangan yang dapat membahayakan kesehatan masyarakat. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar strategi pengendalian dan kontrol *multidrug resistant S. aureus*.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi (Ditjen Diktiristek) Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) yang telah memberi dana penelitian melalui program PMDSU dengan nomor kontrak No. 048/E5/PG.02.00.PL/2024.

Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Pengelola Peternakan Sapi Perah Rakyat di Kecamatan Mojosongo, Boyolali, Direktur Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi dan Pengelola Klinik Hewan di wilayah Yogyakarta dan Semarang yang telah menyediakan sampel untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Abdullahi, I. N., Zarazaga, M., Campana-Burguet, A., Eguizabal, P., Lozano, C., and Torres, C. (2022). Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. *Journal of Applied Microbiology*. 133: 3368-3390.
- Afshar, M. F., Zakaria, Z., Cheng, C. H. and Ahmad, N. I. (2023). Prevalence and multidrug-resistant profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs, cats, and pet owners in Malaysia. *Veterinary World*. 16(3): 536-545.
- Almwafy, A. T., Barghoth, M. G., Desouky, S. E., and Roushdy, M. (2020). Preliminary characterization and identification of Gram positive hemolysis bacteria. *Az. J. Pharm Sci*. 62: 96-109.
- Ariyanti, D., Salasia, S. I. O., and Tato, S. (2011). Characterization of haemolysin of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food of Animal Origin. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 16(1): 32-37.
- Baddour, L. M., Tayidi, M. M., Walker, E., McDevitt, D., and Foster, T. J. (1994). Virulence of coagulase-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *J Med Microbiol*. 41: 259-263.
- Beveridge, T. J. (2000). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*. 76(3): 111-118.
- Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., and Mietzner, T. (2015). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 27th Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Ceniti, C., Britti, D., Santoro, A. M. L., Musarella, R., Ciambone, L., Casalnuovo, F., and Costanzo, N. (2017). Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. *Italian Journal of Food Safety*. 6(6612): 84-87.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 27th Edition*. London: CLSI Document M100-S27.
- Corrente, M., Ventrella, G., Greco, M. F., Martella, V., Parisi, A., and Buonavoglia, D. (2013). Characterisation of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a dog. *Veterinary Microbiology*. 167: 734-736.
- Del'Alamo, L., d'Azevedo, P. A., Strob, A. J., Rodriguez-Lopez, D. V., Monteiro, J., Andrade, S. S., Pignatari, A. C. C., and Gales, A. C. (2007). An outbreak of catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*. 65(3): 226-230.
- Desouky, S. E., El-Gamal, M. S., Mohammed, A. F., and Abu-Elghait, M. A. (2014). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. Isolated from Clinical Samples of Different Egyptian Patients. *World Applied Sciences Journal*. 32(4): 731-740.
- Engelkirk, P. G. and Duben-Engelkirk, J. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fitrandi, M., Salasia, S. I. O., Sianipar, O., Dewananda, D. A., Arjana, A. Z., Aziz, F., Wasissa, M., Lestari, F. B., and Santosa, C. M. (2023). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates derived from humans and animals in Yogyakarta, Indonesia. *Veterinary World*. 16(1): 239-245.
- Kamaruddin, E. (2020). Study of growth patterns of *Staphylococcus aureus* in human blood and sheep. *Biodiversity International Journal*. 4(2): 112-115.

- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabzi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., and Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: Dnase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 9(23): 1-7.
- Katz, D. S. (2016). *Coagulase Test Protocol*. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- Kuipers, A., Koops, W. J., and Wemmenhove, H. (2016). Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J. Dairy Sci*. 99: 1632-1648.
- Leber, A. L. (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC: ASM Press.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Disease Primers*. 4(18033): 1-23.
- Locatelli, C., Gattolin, S., Monistero, V., Castiglioni, B., Moroni, P., Addis, M. F., and Cremonesi, P. (2023). *Staphylococcus aureus coa* gene sequence analysis can prevent misidentification of coagulase-negative strains and contribute to their control in dairy cow herds. *Frontiers in Microbiology*. 14(1120305): 1-8.
- Lubna, Hussain, T., Shami, A., Rafiq, N., Khan, S., Kabir, M., Khan, N. U., Khattak, I., Kamal, M., and Usman, T. (2023). Antimicrobial usage and detection of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: Methicillin- and tetracycline-resistant strains in raw milk of lactating dairy cattle. *Antibiotics*. 12(673): 1-11.
- McAdow, M., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of Innate Immunity*. 4: 141-148.
- Messina, C. G. M., Reeves, E. P., Roes, J., and Segal, A. W. (2002). Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. *FEBS Lett*. 518: 107-110.
- Moreillon, P., Entenza, J. M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T. J., Francois, P., and Vaudaux, P. (1995). Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun*. 63: 4738-4743.
- Moyes, R. N., Reynolds, J., and Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*. DOI: 10.1002/9780471729259.mca03cs15
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetchinski, L., Robies, A. G., and Naghavi, M. *et al.* (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systemic analysis. *The Lancet*. 399(10325): 629-655.
- Natasa, R. S., Vera, K., and Branko, V. (2014). Characteristics of coagulase positive *Staphylococci* isolated from milk in cases of subclinical mastitis. *Acta Veterinaria-Beograd*. 64(1): 115-123.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Review on Antimicrobial Resistance. London: Wellcome Trust.
- Phonimdaeng, P., O'Reilly, M., Nowlan P., Bramley, A. J., and Foster, T. J. (1990). The coagulase of *Staphylococcus aureus*: Sequence analysis of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol. Microbiol*. 4: 393-404.
- Rana, E. A., Islam, M. Z., Das, T., Dutta, A., Ahad, A., Biswas, P. K., and Barua, H. (2021). Prevalence of coagulase-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*. 8(2): 498-508.
- Reiner, K. (2016). *Catalase Test Protocol*. Washington D. C.: American Society for Microbiology.

- Rukumani, D. V., Kamar, A. A., Ardita, D. R., Nee, T. S., Yusof, Y. M., Sekaran, S. D. and Shankar, E. M. (2014). Recalcitrant coagulase-negative methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in an extremely low-birth-weight pre-term infant with thrombocytopaenia. *JMM Case Reports*. DOI 10.1099/jmmcr.0.004242
- Sahibzada, S., Abraham, S., Coombs, G. W., Pang, S., Hernandez-Jover, M., Jordan, D., and Heller, J. (2017). Transmission of highly virulent community-associated MRSA ST93 and livestock-associated MRSA St398 between humans and pigs in Australia. *Scientific Reports*. 7(5273): 1-10.
- Santosaningih, D., Santoso, S., Setijowati, N., Rasyid, H. A., Budayanti, N. S., Suata, K., Widhyatmoko, D. B., Purwono, P. B., Kuntaman, K., Samayanti, S., Prakoeswa, C. R. S., Laurens, M., van Nierop, J. W. I., Nanninga, G. L., Oudenes, N., de Regt, M., Snijders, S. V., Verbrugh, H. A., and Severin, J. A. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* causing community-acquired skin and soft tissue infections on Java and Bali, Indonesia. *Tropical Medicine and International Health*. 23(1): 34-44.
- Sharma, D., Sharma, P. K., and Malik, A. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of drug resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk of dairy cattle. *International Research Journal of Microbiology*. 2(11): 466-470.
- Shields, P. and Tsang, A. Y. (2016). Mannitol Salt Agar Plates Protocols. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Silva, G. O., Castro, R. D., Oliveira, L. G., Sant'Anna, F. M., Barbosa, C. D., Sandes, S. H. C., Silva, R. S., Resende, M. F. S., Lana, A. M. Q., Nunes, A. C., Cerqueira, M. M. O. P., and Souza, M. R. (2020). Viability of *Staphylococcus aureus* and expression of its toxins (SEC and TSST-1) in cheeses using *Lactobacillus rhamnosus* D1 or *Weissella paramesenteroides* GIR16L4 or both as starter cultures. *J. Dairy Sci*. 103: 4100-4108.
- Sunagar, R., Deore, S. N., Deshpande, P. V., Rizwan, A., Sannejal, A. D., Sundareshan, S., Rawool, D. B., Barbuddhe, S. B., Jhala, M. K., Bannalikal, A. S., Mugalikar, D. M., Kumari, V. J., Dhanalakshmi, K., Reddy, Y. N., Rao, P. P., Babra, C., Tiwari, J. G., Mukkur, T. K., Costantino, P., Wetherall, J. D., Isloor, S., and Hegde, N. R. (2013). Differentiation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by PCR for the fibrinogen binding protein gene. *J. Dairy Sci*. 96: 2857-5862.
- Titouche, Y., Akkou, M., Houali, K., Auvray, F., and Hennekinne, J. (2022). Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the dairy production chain. *J. Food. Sci*. 87: 3699-3723.
- Valmorbida, M. K., Cardozo, M. V., Almeida, C. C., Pereira, N., Dezen, D., Assis, M. Z., Verbisck, N. V., Griebeler, E., Pizauro, L. J. L., and Avila, F. A. (2022). Association between *coa* gene and enterotoxin gene in *S. aureus* from dairy cattle in Brazil. *Food Science and Technology*. 43: 1-9.
- Veras, J. F., do Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., dos Santos, D. A., Cerqueira, M. M. O. P., Cantini, A., Nicoli, J. R., and Jett, M. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 12: 410-415.
- Von Eiff. C. (2008). *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31: 507-510.
- Wayne, A., McCarthy, R., and Lindenmayer, J. (2011). Therapeutic antibiotic use patterns in dogs: observations from a veterinary teaching hospital. *Journal of Small Animal Practice*. 52: 310-318.
- Widianingrum, D. C. Windria, S., and Salasia, S. I. O. (2016). Antibiotic Resistance and Methicillin Resistant *Staphylococcus*

aureus Isolated from Bovine, Crossbred Etawa Goat and Human. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11: 122-129.

Antimicrobial Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical and Subclinical mastitis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 6(4): 161-168.

World Health Organization. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva: World Health Organization.

Younis, G., Sadat, A., and Maghawry, M. (2018). Characterization of Coa Gene and