

DETEKSI GEN Coa PADA *Staphylococcus aureus* YANG DIISOLASI DARI SUSU SAPI MURNI

Rizka Ayu Wahyuni¹⁾, Sri Darmawati²⁾, Muhammad Evy Prastiyanto³⁾

- 1) Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang
Email: izkaayuwahyuni18@gmail.com
- 2) Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang
- 3) Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

ABSTRACT

Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi gen Coa pada *S. aureus* yang diisolasi dari susu sapi murni di Kelurahan Gedawang. Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Bakteri *S. aureus* di isolasi dari 15 sampel susu sapi murni. Deteksi gen Coa *S. aureus* menggunakan primer spesifik Forward (5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3') dan primer Coa Reverse (5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3'). Jumlah isolat *S. aureus* yang didapatkan dari Isolasi Bakteri sebanyak 3 sampel positif yang memiliki gen Coa dengan hasil produk 756 bp. Hasil pada penelitian ini menunjukkan hasil positif gen Coa sebesar 100%.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Susu, gen Coa

PENDAHULUAN

Susu merupakan salah satu bahan pangan yang penting untuk mencukupi kebutuhan gizi masyarakat dikarenakan kandungan gizi yang lengkap (Sudono et al. 2003). Produksi susu segar di Indonesia mencapai 91% dihasilkan oleh usaha rakyat, salah satunya di Semarang Jawa Tengah di Kelurahan Gedawang memiliki kawasan sentra sapi perah. Kandungan gizi susu sapi yang lengkap terdiri atas protein, karbohidrat, lemak dan mineral merupakan media yang baik bagi pertumbuhan mikroorganisme, sehingga susu merupakan bahan makanan yang mudah rusak dan tercemar (Harpini, 2008).

Menurut Chye et al (2004) mikroorganisme patogen penyebab foodborne diseases yang dapat mencemari susu antara lain *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp, *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri *S. aureus*

adalah salah satu penyebab utama mastitis pada sapi (Mork et al, 2005). Mastitis akan menyebabkan kerusakan kelenjer penghasil susu, sehingga berpengaruh kepada kualitas produksi susu (Portolano et al, 2007)

Proses pengolahan susu yang tidak bersih berasal dari proses pemerahan susu, penggunaan alat-alat dan distribusi dapat menyebabkan kontaminasi susu oleh *S. aureus* (Zakary 2011). Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit karena mampu berkembang biak dan menyebar luas didalam jaringan tubuh karena mampu menghasilkan enzim koagulase, gen penyandi enzim koagulase (Coa) dapat digunakan sebagai penanda adanya bakteri *S. aureus* (Fatimah,2012). Amplifikasi gen Coa dengan PCR tidak hanya mengkonfirmasi hasil uji fenotif tetapi juga memberikan hasil yang lebih akurat karena uji genotip relatif

stabil bila dibandingkan uji fenotif (McAdow et al. 2012).

METODE

a. Isolasi Bakteri *S. aureus*

Sampel pada penelitian ini di ambil di salah satu sentra sapi perah di Kelurahan Gedawang Kecamatan Banyumanik Semarang Jawa Tengah, Indonesia. Sebanyak 15 sampel susu sapi murni kemudian diisolasi dan identifikasi bakteri *S. aureus*.

b. Isolasi dan Identifikasi bakteri *S. aureus* pada susu sapi murni

Sebanyak 1-2 ml sampel dimasukkan kedalam media BHI (Merck®) inkubasi 1x24 jam suhu 37°C, inokulasikan pada media NA (Merck®) sampai didapatkan koloni terpisah dan berwarna kuning dengan hasil pewarnaan coccus Gram positif kemudian diinokulasikan pada medium BAP(Oxoid®) inkubasi 1x24 jam suhu 37°C. kemudian koloni yang dicurigai *S. aureus* dilakukan pewarnaan gram untuk memastikan bahwa bakteri berbentuk coccus dan bersifat gram positif. Tahap selanjutnya dilakukan uji Biokimia yaitu uji Oksidase, Katalase, Koagulase dan pada media MSA (Oxoid®).

c. Isolasi DNA dan Kuantifikasi DNA sampel

Prosedur isolasi DNA menurut (Anggriani et al, 2017) ambil satu koloni bakteri dari media MSA plate kemudian ditambahkan NaCl fisiologis, disentrifuge 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pellet ditambah 750 µl buffer lysis kemudian di vortex, selanjutnya ditambah dengan 1000 µl DNAzol vortex selama 1 menit dan diamkan selama 30 menit. Kemudian tambahkan kloroform 500 µl, vortex dan inkubasi suhu kamar selama 15 menit. Selanjutnya sentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan lalu dipindah ke tabung eppendorf dan ditambahkan dengan 500 µl isopropanol, bolak-balik tabung secara perlahan, lalu disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, dan endapan dicuci dengan etanol 75%, sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm

selama 1 menit, buang supernatannya, tahap ini dilakukan dua kali untuk mendapatkan kemurnian DNA yang bagus. Selanjutnya Supernatan yang mengandung etanol dibuang dan Pellet dikeringkan, sampai etanol tidak ada, kemudian pellet di tambahkan 50 µl DNA Free Water, vortex. Ini adalah Stok DNA untuk dilanjutkan ke tahap kuantifikasi DNA.

Berdasarkan pengukuran konsentrasi dan kemurniaan DNA dengan menggunakan Spektrofotometer- NanoDrop TM 2000 Thermo Scientific dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan cara sebanyak 2 µl DNA dimasukkan ke spektrofotometer dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 260 nm.

d. Amplifikasi Gen Coa *S. aureus*

Amplifikasi gen Coa menggunakan teknik PCR primer 10 pmol, 25 µL PCR Mix, ddH₂O & DNA templat dan pada penelitian ini menggunakan Metode PCR. Reaksi PCR menggunakan desain primer Coa Forward (5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3') dan primer Coa Reverse (5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3') dengan hasil produk PCR 756 bp. Reaksi PCR juga dibuat dalam total volume 50 µl. Komponen reaksi PCR adalah primer F 5 µl, primer R 5 µl, 25 µl PCR mix, ddH₂O 5 µl, dan templat DNA 10 µl. Campuran yang dihasilkan lalu dihomogenkan dan di spin. Amplifikasi dilakukan (Applied Biosystem 2720 nCycler termal). Siklus PCR dengan denaturasi awal pada 94° C selama 45 detik, denaturasi dengan temperatur 94° C selama 20 detik, annealing dengan temperatur 57° C selama 15 detik, ekstensi dengan temperatur 72° C selama 15 detik dengan annealing terakhir pada 72° C selama 2 menit, dengan siklus amplifikasi sebanyak 30 kali.

Elektroforesis dilakukan untuk melihat profil pita DNA yang sesuai pada medium gel agarosa 2% dengan buffer 0,5X TBE

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Bakteri *S. aureus* pada susu sapi murni

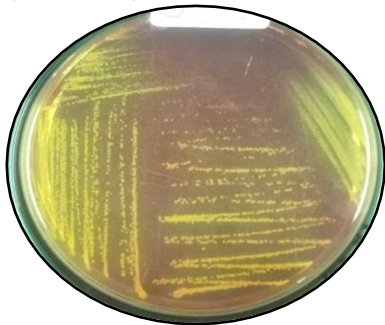
Hasil isolasi dan identifikasi pada media BAP didapatkan hasil bakteri menghasilkan hemolisa sempurna (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Isolasi dan identifikasi pada media BAP

Bakteri *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang tidak mudah untuk diisolasi karena umumnya bercampur dengan flora normal yaitu *S. epidermidis* dan *S. haemolyticus*. Saat ini belum ditemukan media selektif untuk isolasi dan identifikasi koloni *S. aureus* secara langsung, akan tetapi media Mannitol Salt Agar (MSA) dianggap masih memberikan hasil yang baik sehingga direkomendasikan baik oleh BSAC maupun National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) yang saat ini banyak digunakan di seluruh dunia untuk mengisolasi *S. aureus* (Brown et al. 2003)

Hasil isolasi dan identifikasi pada penelitian ini di media Mannitol Salt Agar (MSA) menunjukkan koloni bulat kecil, berkelompok seperti buah anggur, dan memfermentasi warna merah menjadi kuning (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Isolasi dan identifikasi pada media MSA

Hasil Isolasi dan identifikasi bakteri *S. aureus* dari 15 sampel susu sapi murni didapatkan 3 isolat diduga positif bakteri *S. aureus* dan kemudian dilanjutkan ketahap

selanjutnya yaitu isolasi DNA bakteri *S. aureus*.

Hasil Isolasi dan Kuantifikasi DNA sampel

Isolat yang positif terkontaminasi *S. aureus* kemudian dilakukan kuantifikasi atau kemurnian DNA untuk mengetahui tingkat kemurnian dan jumlah DNA yang didapat pada tahap isolasi dan ekstraksi DNA (tabel 1).

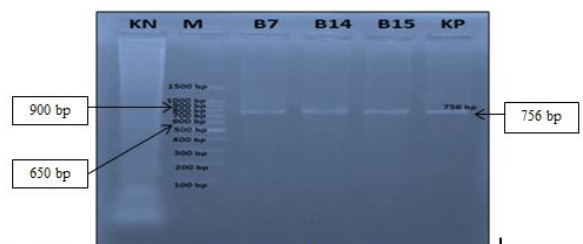
Tabel 1. Hasil Kuantifikasi DNA sampel susu sapi murni

No	Kode Sampel	Kemurnian DNA Absorbansi 260/280	Konsentrasi DNA ng/μl
1	B7 A1	1,67	48,68 ng/μl
2	B14 A1	1,65	47,59 ng/μl
3	B15 A1	1,56	47,66 ng/μl

Hasil kemurnian DNA pada sampel susu sapi murni pada penelitian ini sebesar 1,62. Sampel yang berkualitas baik akan memiliki rasio dari absorbansi panjang gelombang 260 dan 280 nm adalah sebesar 1,8-2,0. Hasil nilai kemurnian DNA pada sampel susu sapi murni pada penelitian ini menunjukkan kemurnian sampel kurang dari 1,8. Berdasarkan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dari hasil ekstraksi DNA maka sampel pada penelitian ini masih memenuhi syarat untuk dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu tahap amplifikasi DNA dengan teknik PCR untuk deteksi gen *Coa*.

Hasil Amplifikasi gen *Coa* dengan teknik PCR

Tahap selanjutnya setelah dilakukan kuantifikasi DNA adalah dengan melakukan amplifikasi gen *Coa* dengan teknik PCR. Pada penelitian ini berdasarkan hasil deteksi gen *Coa* dengan teknik PCR dari 3 isolat sampel susu sapi murni menunjukkan positif gen *Coa* sebesar 100% (Gambar 3.)



Gambar 3. A. Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR pada agarose 2% dimana sebanyak 3 isolat (B7, B14 dan B15) memiliki gen *Coa* dengan pita berukuran sekitar 756 bp dan berat molekul memperlihatkan pita (*band*) antara 650-900 bp.
 B. M = Marker, KN = Kontrol Negatif, KP = Kontrol Positif gen *Coa S. aureus*

Berdasarkan hasil isolasi bakteri *S. aureus* pada sampel susu sapi murni didapatkan 3 isolat yang positif diduga *S. aureus* kemudian 3 isolat *S. aureus* yang diamplifikasi gen Coa pada susu sapi murni menunjukkan hasil positif gen Coa sebesar 100%. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA yang memiliki panjang spesifik 756 bp sesuai dengan penelitian Hookey et al. (1997) yang menggunakan susunan primer yang sama, bahwa hasil amplifikasi dari gen Coa pada *S. aureus* berada pada 650-900 produk PCR dari referensi dan database GeneBank.

Gen Coa adalah suatu penanda adanya enzim koagulase yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus*. Diantara genus *Staphylococcus* hanya *S. aureus* yang memproduksi Koagulase (Coa) dan dapat digunakan untuk membedakan *S. aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya. Data mengenai keberadaan bakteri *S. aureus* berdasarkan gen Coa yang dihasilkan sudah pernah dilaporkan pada penelitian Sanjiv et al. (2008) distribusi gen Coa sebesar 64,28% tidak semua isolat *S. aureus* memiliki gen Coa. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Dehkordi et al. (2015), bahwa distribusi gen Coa *S. aureus* isolat susu sapi mastitis subklinis sebesar 37,5% dan menurut penelitian Karahan & Cetinkaya (2007) distribusi gen Coa isolat asal susu sapi mastitis subklinis memiliki gen Coa. Hal ini sesuai dengan penelitian De silva 2005 & Goh 1992 bahwa gen Coa adalah suatu gen penyandi enzim koagulase dan penanda adanya bakteri *S. aureus*. Uji koagulase dianggap metode sederhana dan efektif untuk mengetahui isolat *S. aureus* dari manusia dan susu sapi mastitis.

Menurut Salasia et. al (2005) dari 56 ekor sapi perah di peternakan sapi perah Baturaden, 41 ekor (73,2%) menderita mastitis subklinis dan 9,1% di antaranya disebabkan oleh *S. aureus*. Bakteri *S. aureus* menjadi salah satu bakteri terpenting penyebab terjadinya food-borne dimasyarakat. Penyebab utama masuknya *S. aureus* ke dalam rantai pangan yang kemudian menyebabkan keracunan adalah karena rendahnya tingkat sanitasi pekerja.

Selain itu faktor lingkungan juga berpengaruh pada tingkat kontaminasi. Menurut Budiyo 2009, secara alamiah susu mengandung bakteri terkontaminasi dari sumbernya : puting, ambing, dan rambut, jika susu tidak ditangani secara tepat maka akan menimbulkan jumlah bakteri didalam susu dapat berkembang dengan cepat. Bakteri *S. aureus* dapat ditemukan didalam saluran pernapasan, permukaan kulit dan rambut hewan berdarah panas termasuk manusia, lebih dari 30-50% populasi manusia "carrier" *S. aureus* (Le Loir et al. 2003). Bakteri *S. aureus* tidak membentuk spora sehingga pertumbuhan oleh *S. aureus* di dalam makanan dapat segera dihambat dengan perlakuan panas. Namun kontaminasi *S. aureus* tetap menjadi salah satu penyebab utama food-borne karena adanya pertumbuhan bakteri patogenik dalam susu sapi dapat menurunkan mutu, keamanan pangan susu dan produksi susu hingga 10-40% (Desmarchelier and fege, 2003; Arimbi dan Koestanti, 2005)

DAFTAR PUSTAKA

- Anggriani, A.D, Koendhori, E.B, Pramono, H. And Wahyono, D.D. 2017. Polymorphism Analysis of the CoA (coagulase) Gene in Isolates Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with alul Restriction Sites. Health Science Journal of Indonesia.
- Arimbi dan E.S Koestanti. 2005. Aplikasi Daun Sambiloto Sebagai Bahan Aktif Dipping Dalam Program Kontrol Mastitis Pada Sapi Perah. *Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*. Universitas Erlangga. Surabaya
- Brown D, Cookson B. 2003. Detection of *MRSA*. In: Fluit Ad C, Schitz FJ (eds). *MRSA: Current perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Budiyo, H. 2009. Analisis Daya simpan produk susu pasteurisasi berdasarkan kualitas bahan baku mutu susu. *Jurnal Paradigma*. 10 (2) : 198-211.
- Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. 2004. Bacteriological quality and safety of

- raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.* 21: 535-541.
- Da Silva, E.R. and N. Da Silva, 2005. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Canadian Journal of veterinary Research.* 69: 260-264.
- Dehkordi, A.A., Tajbakhsh, E., Tajbakhsh, F., Khamesipour, F., Shahraki, M.M. and Momeni, H. (2015) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from Iranian raw milk and dairy products by coagulase gene polymorphisms. *Adv. Studies in Biol.* 7(4): 169-177.
- Desmarchelier PM and N Fegan. 2003. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Foodborne Microorganisms Of Public Health Significance*, 267-310. 6th Ed. AD Hockin. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated.
- Fatimah, I. 2012. *Daya Hambat Kulit Manggis (Garcinia mangostana L) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Karya Tulis Ilmiah, FIKKES, Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Goh, H.S. K.S. Byrne, J.L. Zhang and A.w. Chow., 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene Polymorphisms, *Journal of Clinocal Microbiology.* 30(7): 1642-1645.
- Harpini B. 2008. Upaya menyongsong industry pengolahan dan pemasaran susu pada peternakan rakyat. Dalam: *Prosiding Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan bekerja sama dengan Sekolah Tinggi Ilmu Ekonomi Keuangan dan Perbankan Indonesia” Jakarta.
- J. Hookey, JF. Richardson and B.D. Cookson., 1998. “Molecular typing of *Staphylococcus aureus* Based on PCR-restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene,” *Journal of Clinical Microbiology.* vol 36, pp. 1083-1089.
- Karahan, M. and Cetinkaya, B. (2007) Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *The Vet. J.* 174: 428–431.
- Le loir, Y., Florence, B., dan michel, G. 2003 *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Journal genetic molecular research* 2(1): 63-76.
- Salasia OIS, Wibowo HM. Khusnan. 2005. Karakterisasi fenotipe isolat *Staphylococcus aureus* dari sampel susu sapi perah mastitis subklinis. *Jurnal Sain Veteriner* Vol 23 (2).
- Sanjiv, K., Kataria, A.K., Sharma, R. and Singh, G. (2008) Epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphism of coa gene. *Veterinarski Arhiv.* 78 (1): 31-38.
- Sudono A, Rosdiana FR, Setiawan RS. 2003. *Beternak Sapi Perah Secara Intensif. Agro Media Pustaka.* Jakarta.