

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI FENOTIPE *Staphylococcus aureus* ASAL KASUS BUMBLEFOOT DAN ARTHRITIS PADA BROILER

Identification and Phenotypic Characterization of Staphylococcus aureus Originated from Bumblefoot and Arthritis Cases of Broiler

Khusnan¹, Wahyu Prihtiyantoro², dan Mitra Slipranata²

¹Akademi Peternakan Brahmputra, Yogyakarta

²Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: drh_khusnan@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dan karakterisasi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang berasal dari kasus *bumblefoot* dan *arthritis*. Dalam penelitian ini digunakan 10 isolat *S. aureus* yang terdiri atas lima hasil isolasi asal kasus *bumblefoot* dan lima hasil isolasi asal kasus *arthritis* pada ayam broiler. Identifikasi *S. aureus* dilakukan melalui uji fermentasi *manitol salt agar* (MSA), pewarnaan Gram, uji koagulase, *clumping factor*, dan uji katalase. Karakterisasi fenotipe *S. aureus* yang dilakukan meliputi sifat hemolisis pada plat agar darah, sifat hidrofobitas, dan kemampuan hemaglutinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat *S. aureus* mampu memfermentasi MSA, positif uji koagulase, *clumping factor*, dan katalase. *Staphylococcus aureus* mampu menghemolisis plat agar darah dengan memperlihatkan sifat α -hemolisis (80%), β -hemolisis (10%), and γ -hemolisis (10%). Semua isolat *S. aureus* (100%) bersifat hidrofil dan mampu mengaglutinasi sel darah merah kelinci.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, *bumblefoot*, *arthritis*, broiler, fenotipe

ABSTRACT

This study used 10 isolates of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) consisted of five isolates from cases of *bumblefoot* cases and five isolates from *arthritis* cases. Identification of *S. aureus* based on the fermentation of MSA, Gram staining, coagulase, *clumping factor*, and catalase tests. Phenotypic characterization were performed by type of hemolysis pattern, hydrophobicity properties, and hemagglutination reactions. The results of research showed that all *S. aureus* isolates were positive for MSA fermentation, Gram positive, positive for coagulase, *clumping factor*, and catalase tests. *Staphylococcus aureus* could hemolyse of blood agar with type of α -haemolysis (80%), β -hemolysis (10%), and γ -hemolysis (10%). All *S. aureus* isolates (100%) had hydrophilic surfaces and could agglutinate the rabbit blood cells.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *bumblefoot*, *arthritis*, broiler, phenotypic

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri penyebab utama *bumblefoot* (Satterfield dan O'Rourke, 1981) dan *arthritis* yang menyebabkan gangguan gerakan dan kelumpuhan sendi pada ayam broiler (McNamee dan Smyth, 2000). *Staphylococcus aureus* menyebabkan lebih dari 90% kasus *bumblefoot* (Satterfield dan O'Rourke, 1981) dan lebih dari 50% kasus *arthritis* pada ayam broiler (Rasheed, 2011).

Bumblefoot merupakan radang kronis yang ditandai dengan peradangan, terbentuknya cairan radang, kebengkakan pada daerah metatarsal dan jari unggas (Hester, 1994). *Bumblefoot* yang tidak ditangani akan menyebabkan osteomielitis, sinovitis, laminitis, dan kematian (McNamee dan Smyth, 2000). Pada industri perunggasan, *bumblefoot* menyebabkan menurunnya kualitas karkas dan terhambatnya pertumbuhan karena gangguan gerak ayam (Hester, 1994) yang berakibat kerugian ekonomi (Shane, 2007).

Arthritis pada ayam ditandai dengan kemerahan sendi, panas, bengkak, ayam tampak kesakitan, depresi, pincang, dan enggan untuk berjalan (Jordan *et al.*, 2002). Infeksi *S. aureus* pada unggas selalu berhubungan dengan kasus *arthritis* dan abses di bawah kulit seperti *bumblefoot* (Hill *et al.*, 1989). Penelitian ini bertujuan

melakukan isolasi dan identifikasi *S. aureus* dari spesimen kasus *bumblefoot* dan *arthritis* ayam broiler serta karakterisasi sifat fenotipe yang berperan dalam sifat patogenesis bakteri.

MATERI DAN METODE

Spesimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah lima isolat *S. aureus* asal kasus *bumblefoot* dan lima isolate *S. aureus* asal kasus *arthritis* (sendi antara *tibiotarsus* dan *tarsometatarsus*) ayam broiler. Spesimen ditanam dalam media *tod hewith broth* (THB) dalam tabung reaksi dan diinkubasikan 37° C selama 18-24 jam. Identifikasi *S. aureus* dilakukan dengan memindahkan satu ose bakteri dari media THB ke media *manitol salt agar* (MSA) dalam petri dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh berwarna kuning pada media MSA diduga sebagai *S. aureus*. Pada pewarnaan Gram, *S. aureus* menunjukkan Gram positif dan berbentuk kokus. Uji koagulase dilakukan dengan menginokulasi koloni bakteri pada 1 ml plasma kelinci dalam tabung reaksi dan diinkubasi 37° C selama 4 jam dan 18 jam (Anonimus, 2010a). Plasma yang menggumpal menunjukkan bahwa inokulum tersebut adalah *S. aureus*. Uji *clumping factor* dilakukan dengan mencampurkan plasma kelinci

dengan inokulum yang diduga *S. aureus* pada kaca objek dengan menggunakan ose. *S. aureus* pada uji tersebut akan membentuk presipitat. Uji katalase dilakukan dengan mencampurkan satu ose inokulum dengan satu ose hidrogen peroksida pada kaca objek (Anonimus, 2010b). *Staphylococcus aureus* ditandai dengan bentukan gelembung-gelembung udara.

Karakterisasi sifat hemolisis *S. aureus* dilakukan dengan menanam satu ose isolat pada permukaan plat agar darah domba, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Karakter hemolisis dapat diamati berdasarkan bentuk zona hemolisis di sekeliling koloni bakteri (Skalka *et al.*, 1979).

Uji hidrofobisitas dilakukan dengan menanam bakteri dalam 5 ml THB, diinkubasi pada 37° C selama 24 jam. Kultur bakteri kemudian divortex, dan disentrifus 5 menit pada kecepatan 5.000 rpm. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan *phosphat buffer saline* (PBS) tiga kali. Larutan bakteri dilakukan ditentukan *optical density* (OD) dengan spektrofotometer transmisi dan λ 620 sehingga diperoleh larutan bakteri dengan konsentrasi 10⁸. Sebanyak 50 μ l larutan bakteri dicampur dengan 50 μ l amonium sulfat dengan konsentrasi berturut-turut 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; dan 3,2 M pada objek gelas, dan dicampur dengan tusuk gigi steril. Sifat hidrofobisitas ditentukan berdasar terbentuknya reaksi presipitasi larutan bakteri dengan amonium sulfat (Wibawan *et al.*, 1993).

Uji hemaglutinasi digunakan darah kelinci dengan antikoagulan 0,2 M sodium sitrat pH 5,2. Preparasi eritrosit dilakukan dengan cara darah kelinci disentrifus, 2000 rpm selama 5 menit, cairan jernih dibuang dan endapan yang terbentuk dicuci dua kali dengan 0,15 M NaCl, kemudian dibuat larutan 2% dengan NaCl. Uji ini dilakukan dengan cara mereaksikan 20 μ l larutan bakteri yang telah ditentukan *optical density* (OD) nya dengan spektrofotometer transmisi dan λ 620 nm (kira-kira 10⁹ bakteri/ml 0,15 NaCl) dengan 20 μ l larutan eritrosit kelinci dalam mikroplat. Bakteri yang mengaglutinasi eritrosit akan terlihat larutan berwarna merah difus, sedangkan yang tidak bereaksi dengan eritrosit akan tampak endapan merah di bawah sumuran mikroplat (Wibawan *et al.* 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa semua (10) isolat *S. aureus* yang berasal ayam broiler penderita *bumblefoot* dan *arthritis* mampu memfermentasi MSA, Gram positif, berbentuk kokus, positif pada uji-uji: koagulase, *clumping factor*, dan katalase seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan karakterisasi fenotipe terhadap *S. aureus* yang dilakukan diperoleh hasil bahwa 100% isolat mampu menggumpalkan eritrosit kelinci dan 100% bersifat hidrofил serta tipe hemolisis menunjukkan 80% memperlihatkan sifat α -hemolisis, 10% β -hemolisis, dan 10% γ -hemolisis. Kemampuan hemaglutinasi berkaitan erat dengan kemampuan bakteri dalam melekat pada epitel hospes. Hemaglutinin adalah salah satu substansi yang diproduksi oleh bakteri yang berperan sebagai faktor adhesin bersama-sama fimbriae untuk perlekatan pada sel-sel hospes sebagai awal dari proses infeksi (Kurl *et al.* 1989; Chanter *et al.*, 1993). Hubungan antara sifat-sifat hemaglutinasi dan kemampuan bakteri untuk melekat pada sel-sel hospes telah diteliti pada berbagai spesies bakteri (Kurl *et al.*, 1989; Wibawan *et al.*, 1993; Lämmler *et al.*, 1993). Salasia *et al.* (2005) melaporkan *S. aureus* yang berasal dari produk pangan asal hewan sebanyak 91,7% mampu mengaglutinasi sel darah merah.

Karakter hemolisis yang ditampilkan oleh *S. aureus* yang diteliti menunjukkan 80% α -hemolisis, 10% β -hemolisis, dan 10% γ -hemolisis. Hemolisin merupakan enzim yang bersifat toksik, dapat melisis sel darah merah, berperan dalam meningkatkan permeabilitas sel, sehingga sel lebih rentan terhadap agen infeksi. Menurut Park *et al.* (2004) hemolisin pada *S. aureus* berperan sebagai faktor patogenisitas dan merupakan salah satu toksin penting yang dibentuk oleh *S. aureus*. Menurut Jawetz *et al.* (1982), α -hemolisin dapat melarutkan eritrosit kelinci dan merusak trombosit, merusak sistem sirkulasi, jaringan otot dan jaringan korteks ginjal, dan dapat menimbulkan kerusakan berbagai jaringan. Beta-toksin (beta-hemolisin) dilaporkan dapat menyebabkan *hot-cold*. Reaksi toksin ini dalam kondisi dingin (pada suhu 4° C) akan meningkat dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan meningkatkan hemolisis (Joklik *et al.*, 1992).

Tabel 1. Hasil identifikasi dan karakterisasi *S. aureus* dari spesimen ayam broiler penderita *bumblefoot* dan *arthritis*

No.	Kode	MSA	Gram	Bentuk	Koa	CF	HA	Hemolisis	HF
1	BF6	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
2	BF9	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
3	BF16	Kuning	+	Kokus	+	+	+	β	Hidrofil
4	K10	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
5	K13	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
6	Art4	Kuning	+	Kokus	+	+	+	γ	Hidrofil
7	Art6	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
8	Art7	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
9	Art9	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil
10	Art11	Kuning	+	Kokus	+	+	+	α	Hidrofil

Koa= koagulase, CF= *clumping factor*, HA= hemaglutinasi, HF=hidrofobisitas

Selanjutnya, Salasia *et al.* (2005) melaporkan *S. aureus* yang berasal dari susu sapi menunjukkan 5,3% α -hemolisis, 59% β -hemolisis dan 35,7% α/β -hemolisis. *Staphylococcus aureus* yang berasal dari susu kambing peranakan Ettawah menunjukkan 100% β -hemolisis (Purnomo *et al.*, 2006).

Sifat hidrofobitas pada *S. aureus* yang diteliti menunjukkan semua isolat bersifat hidrofil. Sifat hidrofobitas bakteri ditentukan oleh struktur molekul yang berada pada permukaan bakteri, termasuk kapsul. Kapsul bakteri yang terdiri dari unsur polisakarida akan menentukan sifat hidrofobitas yang akan bertanggung jawab terhadap kemampuan adesi pada sel epitel inang (Hasty *et al.*, 1992; Salasia *et al.*, 1995). Bakteri yang mempunyai kapsul akan bersifat hidrofil (Tizard, 1982). Bakteri yang berkapsul umumnya lebih patogen dibandingkan dengan bakteri yang tidak berkapsul (Wibawan *et al.*, 1993) dan bersifat lebih virulen dan sebaliknya bakteri yang tidak mempunyai kapsul kurang virulen (Pelczar dan Chan, 1988). Sebaliknya bakteri-bakteri yang bersifat hidrofob pada permukaan selnya tidak berkapsul, tetapi tersusun dari molekul-molekul protein. Bakteri yang bersifat hidrofob, akan mudah melekat pada sel epitel pada proses adesi akan mudah difagosit oleh sel-sel polimorfonuklear leukosit (Salasia dan Lämmler, 1995; Salasia *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Berdasarkan pada karakterisasi fenotipe, kemampuan hemaglutinasi, produksi hemolisin, dan sifat hidrofobitas dapat disimpulkan bahwa *S. aureus* bersifat patogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Publikasi ini merupakan sebagian dari hasil Penelitian Fundamental yang dibiayai oleh DP2M Dikti Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Tahun Anggaran 2011. Kepada Arisa Diana Ekawati, Dianita Dwi Sugiartini, Eka Yanuarti, dan Imam Hanafi diucapkan terima kasih atas bantuan dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2010a. Coagulase Test. National Standart Method. Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training. www.evaluations-standards.org.uk.
- Anonimus. 2010b. Catalase Test. American Society for Microbiology. <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory%20test/3241-catalase-test>.
- Chanter, N., P.W. Jones, and T.J.L. Alexander. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*-a speculative review. *Vet. Microbiol.* 36:39-55.
- Hasty, D.L., I. Ofek, H.S. Courtney, and R.J. Doyle. 1992. Minireview: Multiple adhesins of streptococci. *Infect. Immun.* 60:2147-2152.
- Hester, P. Y. 1994. The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. *Poult. Sci.* 73:904-915.
- Hill, J.E., G.N. Rowland, J.R. Glisson, and P. Villegas. 1989. Comparative microscopic lesions in reoviral and staphylococcal tenosynovitis. *Avian Diseases* 33:401-410.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, and E.A. Adelberg. 1982. *Microbiology for Medicine*. 14th ed. Lange Medical Publications. Los Altos. California.
- Joklik, W.K., H.P. Willett, D.B. Amos, and C.M. Wilfert. 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th ed. Appleton and Lange. California.
- Jordan, F., M. Pattison, D. Alexander, and T. Faragher. 2002. *Poultry Diseases*. 5th ed. W.B.Saunders. London.
- Kurl, D.N., S. Haataja, and J. Finne. 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D and G streptococci: Demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 57:384-389.
- Lämmler, C., S.U. Pramono, I.W.T. Wibawan, S.I.O. Salasia, and S. Estoe pangesti. 1993. *Pathogenic Streptococci: Present and Future*. Lancer Publications. Russia.
- McNamee, P.T. and J.A. Smyth. 2000. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head) of broiler chicken: A review. *Avian Pathol.* 29:253-270.
- Park, P.W., T.J. Foster, E. Nishi, S.J. Duncan, M. Klagsbrun, and Y. Chen. 2004. Activation of Syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* α -toxin and β -toxin. *J. Biol. Chem.* 279(1):251-258.
- Pelczar, M. and E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. (Diterjemahkan oleh Hadiutomo, R.S., T. Imas, S.S. Tjitosumo, dan S.L. Angka. UI Press. Jakarta
- Purnomo, A., Hartatik, Khusnan, S.I.O. Salasia, dan Soegiyono. 2006. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* of milk of Ettawa crossbred goat. *Media Kedokteran Hewan* 22(3):142-147.
- Rasheed, B.Y. 2011. Isolation and identification of bacteria causing arthritis in chickens. *Iraqi Jur. Vet. Sci.* 25(2):93-95.
- Salasia, S.I.O. and C. Lämmler. 1995. Occurrence of haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med. Sci. Res.* 22:763-764.
- Salasia, S.I.O., C. Lämmler, and G. Hermann. 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet. Microbiol.* 45:151-156.
- Salasia, S.I.O., Khusnan, C. Lämmler, and M. Zschöck, 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java, Indonesia and Hesse, Germany. *J. Vet. Res.* 5(2):103-109.
- Salasia, S.I.O., M.H. Wibowo, dan Khusnan. 2005. Karakterisasi fenotipe *Staphylococcus aureus* isolat dari sampel susu sapi perah mastitis sub klinis. *J. Sain Vet.* 23:72-78.
- Satterfield, W.C. and K.I. O'Rourke. 1981. Staphylococcal bumblefoot (claw disease of birds): Vaccination and immunomodulation in the early treatment and management. *J. Zoo Anim. Med.* 12:95-98.
- Shane, S. 2007. Good Growing Leads to Performance, Quality. <http://www.wattpoultry.com/poultryusa>.
- Skalka, B., J. Smola, and J. Pillich. 1979. A simple method of detecting staphylococcal hemolysin. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 245:283-286.
- Tizard, I. 1982. *An Introduction Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Wibawan, I.W.T., C. Lämmler, R.S. Seleim, and F.H. Pasaribu. 1993. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* 139:2173-2178.