

Identifikasi Keberadaan Gen *mecA*, *mecC* dan *blaZ* pada Isolat Tersimpan *Staphylococcus aureus* Asal Susu Sapi Perah Mastitis Subklinis

(*Identification of mecA, mecC and blaZ Genes in Stored Staphylococcus aureus Isolates from Cow Milk with Subclinical Mastitis*)

Ghina Nazalia¹, Sarasati Windria^{1,2}, Adi Imam Cahyadi^{2*}

¹Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, 45363, Indonesia

²Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, 45363, Indonesia

*Korespondensi Email: adi.imam@unpad.ac.id

ABSTRACT

*Mastitis is an inflammation of the bovine udder that can reduce both the quantity and quality of milk. This condition is commonly caused by Staphylococcus aureus which has the ability to develop resistance to antibiotics. The most frequently reported resistance is associated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), with the possible involvement of β -lactamase enzymes. This study aimed to identify resistance-encoding genes, namely *mecA*, *mecC*, and *blaZ*, in stored Staphylococcus aureus isolates obtained from the milk of dairy cows with subclinical mastitis. The study was conducted using phenotypic and genotypic approaches to reconfirm the species of Staphylococcus aureus. The identification results showed that 22 of 28 isolates (78,6%) were confirmed as Staphylococcus aureus. Antibiotic susceptibility testing using the Kirby–Bauer method showed that 2 of 22 isolates (9,1%) were resistant to penicillin G, while all isolates (100%) remained sensitive to cefoxitin. PCR results showed that 5 of 22 isolates (22,7%) carried the *blaZ* gene, whereas none of the isolates (0%) were detected to carry the *mecA* or *mecC* genes. These findings indicate that the resistance mechanism in stored Staphylococcus aureus isolates from dairy cows with subclinical mastitis in Tanjungsari District is associated with β -lactamase production.*

Keywords: Antibiotic; Mastitis; PCR; Resistance; Staphylococcus aureus

PENDAHULUAN

Susu sapi merupakan salah satu hasil ternak yang berperan sebagai sumber protein hewani dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat (Wardani *et al.*, 2020). Tingkat konsumsi susu di Indonesia mencapai 16 liter per kapita per tahun, namun pemenuhan kebutuhan tersebut masih

terkendala oleh rendahnya produksi domestik yang baru mencapai 820.874 ton (BPS, 2025). Kesenjangan antara permintaan nasional yang tinggi dengan kapasitas produksi lokal yang terbatas menunjukkan adanya ketergantungan impor sebesar kurang lebih 80%.

Dalam upaya menekan defisit produksi tersebut, optimalisasi produktivitas melalui peningkatan status kesehatan ternak menjadi faktor yang sangat krusial. Penyakit infeksius seperti mastitis merupakan tantangan utama yang secara langsung menghambat pencapaian target produksi nasional melalui penurunan kuantitas dan kualitas susu yang dihasilkan (Windria *et al.*, 2022).

Mastitis merupakan peradangan pada jaringan ambing sapi yang dapat dibagi ke dalam dua bentuk yaitu subklinis dan klinis dengan prevalensi mastitis subklinis lebih tinggi yaitu sebesar 97-98% (Ningrum *et al.*, 2022). Penyebab umum kondisi ini adalah infeksi bakteri *Staphylococcus aureus*, yang memiliki kemampuan membentuk resistensi terhadap berbagai antibiotik. Strain *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang dikode oleh gen *mecA* atau *mecC* mengakibatkan resistensi luas terhadap antibiotik β -laktam, sementara gen *blaZ* memperkuat mekanisme tersebut melalui produksi enzim penisilinase (Juwita *et al.*, 2024). Fenomena ini menyebabkan kegagalan terapi di tingkat peternakan

serta meningkatkan risiko transmisi bakteri resisten ke manusia melalui produk asal hewan (Solyman *et al.*, 2024; Khairullah *et al.*, 2020).

Resistensi antibiotik dijuluki sebagai *silent pandemic* karena pertumbuhannya perlahan namun pasti serta diperkirakan dapat menjadi penyebab kematian utama tahun 2050. Data menunjukkan 4.95 juta kematian terkait infeksi bakteri resisten pada tahun 2019 (Murray *et al.*, 2022). Kondisi infeksi akibat bakteri yang memiliki gen resisten menyebabkan proses pengobatan menjadi lebih sulit karena pilihan antibiotik yang efektif terbatas. Sapi yang terinfeksi berpotensi menimbulkan ancaman kesehatan karena gen resisten dapat ditularkan kepada manusia melalui produk asal hewan seperti susu (Khairullah *et al.*, 2020).

Melihat besarnya ancaman, deteksi keberadaan gen penyandi resistensi menjadi penting oleh karena itu peneliti bertujuan mengetahui keberadaan gen *mecA*, *mecC*, dan *blaZ* pada isolat tersimpan *Staphylococcus aureus* asal susu sapi perah mastitis subklinis dengan menggunakan metode PCR.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan menggunakan 28 isolat tersimpan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari susu sapi perah terdiagnosis mastitis subklinis (skor CMT positif 2/++) di Kecamatan Pamulihan,

Kabupaten Sumedang. Isolat diremajakan pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Konfirmasi spesies dilakukan secara fenotipik melalui pewarnaan Gram, kultur pada

media selektif *Mannitol Salt Agar* (MSA), serta uji biokimia (katalase, koagulase, dan DNase) di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

Uji sensitivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* menggunakan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dan cakram antibiotik *cefloxitin* (FOX; 30µg) serta *penicillin G* (P; 10 IU). Suspensi bakteri dengan kekeruhan 0,5 *McFarland* diinokulasikan pada permukaan agar, diikuti peletakan cakram antibiotik dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan berdasarkan standar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024).

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Geneaid™ DNA Isolation Kit* (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) sesuai protokol untuk bakteri Gram positif. tahap lisis melibatkan

inkubasi dalam *water bath* pada suhu 60°C selama 10 menit. Pemurnian DNA dilakukan melalui sentrifugasi pada kecepatan 14.000 RPM. Identifikasi gen penyandi resistensi dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan mesin PCR (Miulab, tipe MT-20) dengan total volume reaksi 25µL yang terdiri dari *PCR Mastermix* (Thermo Scientific), *nuclease-free water*, *primer* spesifik (Tabel 1), dan *template* DNA. Program PCR meliputi pra-denaturasi (94°C, 2 menit), 30 siklus amplifikasi (denaturasi 94°C, *annealing* sesuai Tabel 1, ekstensi 72°C), dan post-ekstensi (72°C, 5 menit). Hasil amplifikasi dianalisis melalui elektroforesis pada agarose 2% dengan pewarna *prime juice* (Bio-helix), divisualisasikan menggunakan *UV transilluminator* (Bio-Rad, tipe Gel Doc), serta dibandingkan dengan DNA *ladder* 100 bp (GeneDireX).

Tabel 1. Desain primer spesifik dan program annealing untuk gen 23S rRNA dan gen penyandi resistensi

Gen	Sekuens Primer	Annealing	Ukuran Target (bp)
23S rRNA ^a	5' ACGGAGTTACAAAGGACGAC 3' 3' AGCTCAGCCTTAACGAGTAC 5'	64°C	1250
<i>mecA</i> ^b	5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' 3' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 5'	55°C	533
<i>mecC</i> ^c	5' GTCCCTAACAAAACACCCAAAGA 3' 3' GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC 5'	57°C	454
<i>blaZ</i> ^d	5' ACTTCAACACCTGCTGCTTTC 3' 3' TGACCACTTTTATCAGCAACC 5'	61°C	173

^aStraub *et al.* (1999); ^bStrommenger *et al.* (2003). ^cTchamba *et al.* (2021); ^dMartineau *et al.* (2000)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konfirmasi spesies dari isolat tersimpan dilakukan secara fenotipik dan genotipik. Koloni pada media *Blood Agar Plate* (BAP) menunjukkan bentuk bulat, halus, berkilau, dengan pigmentasi warna abu-abu hingga kuning keemasan, Gram positif berbentuk kokus yang terlihat melalui pemeriksaan mikroskopis, mampu memfermentasi manitol pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA), memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen, menghasilkan enzim koagulase serta DNase. *Staphylococcus aureus* dapat diidentifikasi dan dikarakterisasi secara fenotipik akan tetapi identifikasi secara genotipik tetap diperlukan untuk menghindari kekeliruan identifikasi dengan spesies yang lain (Aziz *et al.*, 2016). Identifikasi genotipik dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi gen *23S rRNA*. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 22 dari 28 isolat (78,6%) membentuk pita DNA (*band*) berukuran 1.250 bp, yang mengonfirmasi isolat tersebut sebagai bakteri spesies *Staphylococcus aureus*.

Seluruh isolat yang telah terkonfirmasi tersebut kemudian dilanjutkan ke tahap uji sensitivitas antibiotik menggunakan metode *Kirby-Bauer*. Hasil menunjukkan tingkat sensitivitas yang kontras yaitu 100% isolat (22/22) sensitif terhadap

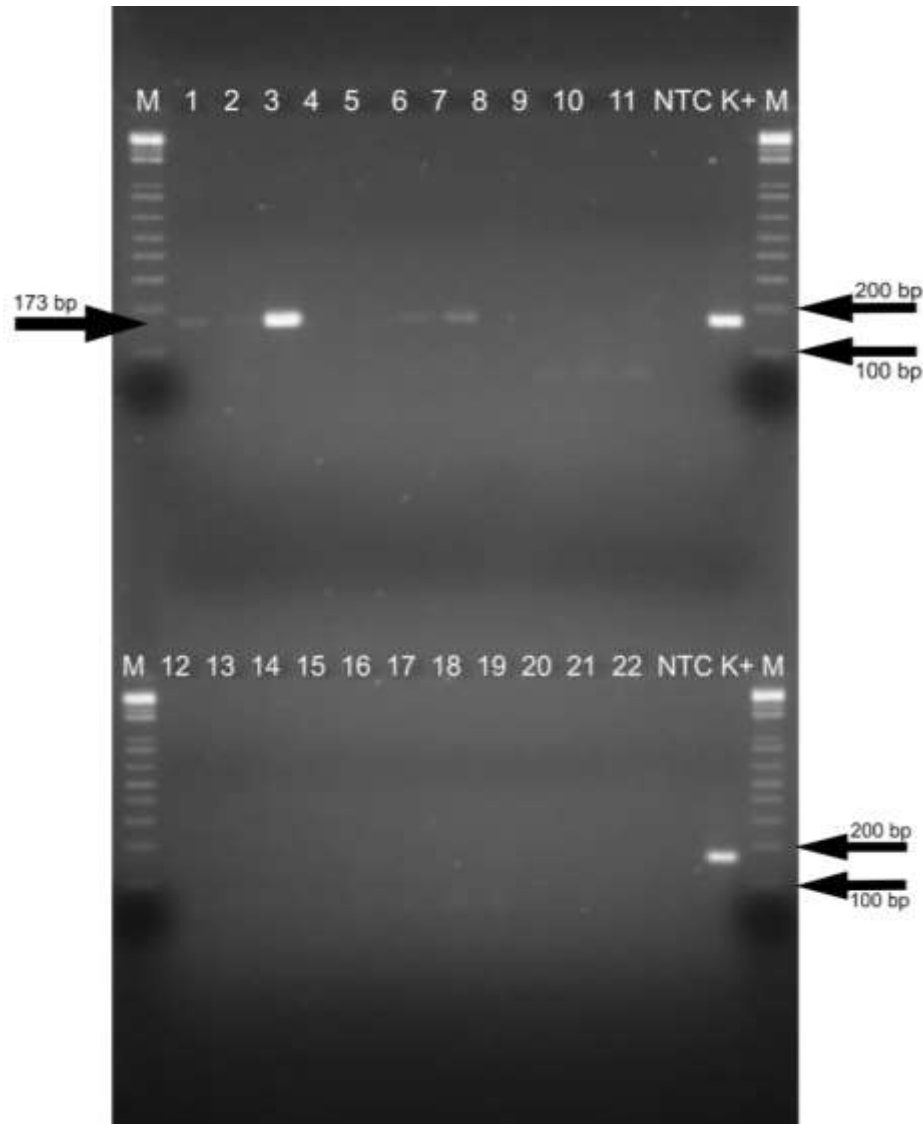
cefoxitin (FOX; 30 μ g), yang secara fenotipik mengindikasikan isolat tersebut bukan MRSA. Sebaliknya, pada uji *penicillin G* (P; 10 IU), ditemukan 2 isolat (9,1%) menunjukkan resistensi, sementara 20 isolat (90,9%) tetap sensitif. Resistensi pada kedua isolat tersebut diduga berkaitan dengan produksi enzim β -laktamase (disandi oleh gen *blaZ*) yang menghidrolisis cincin β -laktam antibiotik (Juwita *et al.*, 2024). Rendahnya tingkat resistensi ini menunjukkan bahwa penggunaan *penicillin* dalam penanganan mastitis subklinis di lokasi penelitian masih memiliki efektivitas yang tinggi.

Deteksi terhadap gen *mecA* dan *mecC* melalui metode PCR dilakukan sebagai langkah konfirmasi status non-MRSA tersebut secara genotipik. Hasil ini mengonfirmasi bahwa seluruh isolat *S. aureus* asal susu sapi perah mastitis subklinis tidak memiliki gen *mecA* maupun *mecC*. Oleh karena itu, isolat-isolat tersebut diklasifikasikan sebagai *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA) (Boswihi *et al.*, 2024).

Hasil uji PCR ini selaras dengan uji sensitivitas terhadap antibiotik yaitu seluruh isolat (100%) menunjukkan sensitivitas terhadap *cefoxitin*. Temuan ini sejalan dengan penelitian Aziz *et al.* (2016), yang melaporkan ketiadaan gen *mecA* (0%) yang terdeteksi dari 11 isolat *Staphylococcus aureus* asal susu sapi mastitis subklinis di Yogyakarta.

Hasil identifikasi gen *mecC* sesuai dengan penelitian Silva *et al.*, (2021), yang tidak menemukan keberadaan

gen *mecC* (0%) dari 335 isolat *Staphylococcus aureus* asal susu sapi perah.



Gambar 1. Hasil visualisasi gel elektroforesis produk PCR gen *blaZ* (173 bp).
Keterangan: M=Marker 100 bp; Sumuran 1-22=Isolat *Staphylococcus aureus* sampel;
NTC=*Non-Template Control*; K+=Kontrol Positif.

Hasil PCR gen *blaZ* menunjukkan lima isolat (22,7%) menunjukkan *band* sesuai dengan ukuran target produk (Gambar 1). Salah satu isolat menunjukkan *band* berukuran 173 bp menandakan isolat tersebut positif mengandung gen *blaZ* sesuai dengan hasil pemeriksaan

fenotipik sensitivitas antibiotik yang resisten terhadap *penicillin G*. Empat isolat lainnya memiliki pita DNA berukuran 173 bp, tetapi tidak diikuti oleh kesesuaian hasil pada uji fenotipik. Temuan gen *blaZ* selaras dengan hasil penelitian Aziz *et al.*, (2016) yang melaporkan keberadaan

gen *blaZ* pada 5 dari 11 isolat (45,4%) asal susu sapi mastitis subklinis. Perbedaan ini dapat terjadi karena keberadaan gen tidak selalu diikuti oleh ekspresi fenotipik, sehingga isolat tetap dikategorikan positif gen *blaZ* (Monistero *et al.*, 2020). Terdapat satu isolat yang tidak menunjukkan keberadaan *band* sesuai dengan ukuran target produk namun secara fenotipik isolat resisten terhadap *penicillin G*. Fenomena ini mengindikasikan peran mekanisme resistensi lain seperti mutasi genetik pada daerah pengikatan primer yang

mengubah urutan basa DNA target sehingga tidak terjadi amplifikasi. Mutasi spontan seperti delesi basa tunggal pada homopolimer turut menonaktifkan gen *blaZ*. Gen regulator lain seperti *pbp4* dan *gdpP* turut berperan dalam resistensi β -laktam. Mutasi atau peningkatan ekspresi *pbp4* dapat memperkuat struktur dinding sel sedangkan mutasi pada *gdpP* dapat meningkatkan kemampuan adaptasi bakteri terhadap tekanan antibiotik (Verdiani *et al.*, 2025).

KESIMPULAN

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 22 dari 28 isolat (78,6%) terkonfirmasi sebagai *Staphylococcus aureus*. Uji sensitivitas antibiotik menunjukkan 2 dari 22 isolat (9,1%) resisten terhadap *penicillin G*, sementara seluruh isolat (100%) tetap sensitif terhadap *cefoxitin*. Analisis genotipik membuktikan keberadaan gen *blaZ* pada 5 isolat (22,7%), sedangkan gen *mecA* dan *mecC* tidak terdeteksi (0%)

pada seluruh isolat yang diuji. Penelitian ini menyimpulkan bahwa isolat *S. aureus* asal susu sapi perah mastitis subklinis di Kecamatan Pamulihan, Kabupaten Sumedang, bukan merupakan MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), namun memiliki potensi ancaman resistensi melalui mekanisme produksi β -laktamase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Sarasati Windria, drh. dan Adi Imam Cahyadi, dr., M.Kes. selaku dosen pembimbing atas arahan dan masukan yang diberikan sehingga penulis dapat

menyelesaikan artikel ini serta kepada staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran atas fasilitas dan bantuan teknis selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aziz F, Lestari FB, Nuraidah S, Purwati E, Salasia SIO. 2016. Deteksi gen penyandi sifat resistensi metisilin, penisilin, dan tetrasiklin pada isolat *Staphylococcus aureus* asal susu mastitis subklinis sapi perah. *Jurnal Sain Veteriner* 34(1).
- Badan Pusat Statistik. 2025. Produksi susu segar menurut provinsi. *Badan Pusat Statistik*.
- Boswihi SS, Alfouzan WA, Udo EE. 2024. Genomic profiling of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolates in Kuwait hospitals. *Frontiers*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI standard M100, 34th edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Geneaid Biotech Ltd. 2008. Advantages Geneaid™ DNA Isolation Kit: *Instruction Manual*. pp. 1–16.
- Juwita S, Indrawati A, Damajanti R, Safika, Mayasari NLP, Purwanto E, Halik H, Ramadhan M, Suhartila. 2024. Pendekatan One Health: deteksi gen blaZ dari isolat *Staphylococcus aureus* asal peternakan sapi perah di Sulawesi Selatan. *Jurnal Veteriner* 25: 122–131.
- Khairullah AR, Sudjarwo SA, Effendi MH, Harijani N, Tyasningsih W, Rahmahani J, Permatasari DA, Ramandinianto SC, Widodo A, Riwu KHP. 2020. A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on milk and milk products: public health importance. *Systematic Reviews in Pharmacy* 11(8): 59–69.
- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(2): 231–238.
- Monistero V, Barberio A, Biscarini F, Cremonesi P, Castiglioni B, Graber HU, Bottini E, Ceballos-Marquez A, Krömker V, Petzer IM, Pollera C, Santisteban C, Santos M, Bronzo V, Piccinini R, Re G, Cocchi M, Moroni P. 2020. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of antimicrobial resistance

- genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. *Journal of Dairy Science* 103.
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Knight Knight. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 399(10325): 629-655.
- Ngassam C, Duprez JN, Lucas P, Blanchard Y, Boyen F, Haesebrouck F, Argudín MÁ, Mainil J, Thiry D. 2021. Comparison of the staphylococcal chromosome cassette (*SCCmec*) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and non-*aureus* staphylococci from animals and humans. *Antibiotics*.
- Ningrum IP, Soeharsono, Wibawati PA, Dhamayanti Y, Yunita MN. 2022. The risk factor of subclinical mastitis incident in dairy cattle in KPSP Ijen Makmur, Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*. 5(1): 48–53.
- Silva J, Camargo A, Melo R, Aragão B, Oliveira J, Sena M, Nero L, Mota R. 2021. *mecA*-positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cow farms in the Northeast region of Brazil. *Ciência Rural*.
- Solyman SM, Al-Mubarak AIA, Abass NY. 2024. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy cows: Public health concern and economic impact. *Frontiers in Veterinary Science*.
- Straub JA, Hertel C, Hammes WP. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection* 62(10): 1150–1156.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(9): 4089–4094.
- Verdiani I, Pestariati, Puspitasari A. 2025. Deteksi gen *blaZ* pada *Staphylococcus aureus* isolat urine pasien ISK menggunakan metode *real-time* PCR. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*. 9(1): 40–45.
- Wardani D, Sujana D, Nurul N. 2020. Pemeriksaan kadar protein pada susu sapi segar asal peternakan Cilawu

Kabupaten Garut dengan metode Kjeldahl. *Jurnal Sains dan Teknologi Laboratorium Medik* 5(2): 18–22.

Windria S, Cahyadi AI, Wiraswati HL, Ramadhanti J, Wismandanu O, Madani HA, Larasati SA. 2022. Mastitis di Jawa Barat, Indonesia: Etiologi dan Opsi Pencegahan. *Jurnal Sain Veteriner*. 40(1): 52-64.