

Komparasi Fenotipik dan Genotipik Sifat Resisten Isolat *Staphylococcus aureus* terhadap Golongan Antibiotik β -laktam dan Tetrasiklin

The Comparisons of Phenotypic and Genotypic Resistance of Staphylococcus aureus Isolates Against β -lactam and Tetracycline Antibiotics

Fatkhanuddin Aziz^{1*}, Fauziah Fitriana¹, Dian Ritma Setyorini¹, Shafira Amalia Putri¹, Tifa Restyka Maulina¹, Vira Kartika Dewi¹, Nur Ika Prihanani¹, dan Morsid Andityas¹

¹Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Veteriner, Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia
Email: fatkhanuddin.aziz@mail.ugm.ac.id

Naskah diterima: 26 Mei 2023, direvisi: 20 Juni 2023, disetujui: 17 Juli 2023

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a Gram-positive bacteria that causes various diseases in humans and animals. Treatment of *S. aureus* infection generally uses antibiotics, but what happens is, *S. aureus* resistance to antimicrobial agents is an increasing global problem. This study aims to compare the phenotypic and genotypic characters of *S. aureus* from animal isolates against β -lactam and tetracycline antibiotics class. Determination of resistance characteristics of 8 *S. aureus* isolates was carried out phenotypically by Kirby Bauer and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) methods, while genotypically by detecting the *blaZ* and *tet* genes. The correlation between the diameter of the Kirby Bauer test results and the MIC level was tested statistically using R software. The results of the study showed a relationship between resistance genes and phenotypic test results using the Kirby Bauer and MIC methods. Isolates C, D, F, and TLK with resistance gene characters *blaZ*, *tetK*, and *tetM* showed a sensitive interpretation of the results of the Kirby Bauer and MIC tests. On the other hand, DMG, J, PGT, and KRG isolates were resistant to one or two antibiotics tested, both phenotypic and genotypic (*blaZ*⁺, *tetK*⁺/*tetM*⁺). It found that the MIC levels of some respective isolates were relatively high, isolates J and KRG had an ampicillin MIC level of 32 μ g/ml, while isolates J and PGT had 256 μ g/ml for oxytetracycline. Although the identification of resistance genes and Kirby Bauer can determine the character of bacterial resistance, MIC determination is necessary to provide qualitative and quantitative information for the benefit of making therapeutic decisions and infection control strategies.

Keywords: antibiotics; resistance; *Staphylococcus aureus*

Abstrak

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram positif penyebab berbagai penyakit pada manusia dan hewan. Pengobatan infeksi *S. aureus* umumnya menggunakan antibiotik, namun yang terjadi, resistensi *S. aureus* terhadap agen antimikroba merupakan masalah global yang semakin meningkat. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter fenotipik dan genotipik pada isolat *S. aureus* asal hewan terhadap antibiotik golongan β -laktam dan tetrasiklin. Determinasi sifat resistensi 8 isolat *S. aureus* asal hewan dilakukan secara fenotipik dengan metode Kirby Bauer dan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), sedangkan genotipik dengan deteksi gen *blaZ* dan *tet*. Korelasi antara diameter hasil uji Kirby Bauer dengan level MIC diuji statistik menggunakan R *software*. Hasil penelitian menunjukkan hubungan antara gen resisten dengan hasil uji fenotipik menggunakan metode Kirby Bauer dan MIC. Isolat C, D, F, dan TLK dengan karakter gen resisten *blaZ*, *tetK*, dan *tetM* memperlihatkan interpretasi sensitif pada hasil uji Kirby Bauer dan MIC. Sebaliknya isolat DMG, J, PGT, dan KRG mempunyai sifat resisten pada satu atau dua antibiotik yang diuji

baik secara fenotipik maupun genotipik (*blaZ*⁺, *tetK*⁺/*tetM*⁺). Diketahui, level MIC beberapa isolat tersebut tergolong tinggi, isolat J dan KRG mempunyai level MIC ampicilin sebesar 32 µg/ml, sedangkan isolat J dan PGT sebesar 256 µg/ml terhadap oksitetrasiklin. Meskipun identifikasi gen resisten dan Kirby Bauer dapat mengetahui karakter resistensi bakteri, namun determinasi MIC perlu dilakukan untuk memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif bagi kepentingan pengambilan keputusan tindakan terapeutik dan strategi pengendalian infeksi.

Kata kunci: antibiotik; resistensi; *Staphylococcus aureus*

Pendahuluan

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan salah satu bakteri Gram positif penyebab berbagai penyakit pada manusia dan hewan (Kitagawa *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2019). *S. aureus* pada manusia dilaporkan sebagai penyebab utama bakteremia, endokarditis, osteomyelitis, infeksi kulit dan jaringan lunak, serta *pleuropulmonary* (Kitagawa *et al.*, 2019; Aziz *et al.*, 2020; Miyake *et al.*, 2022). Sedangkan pada hewan khususnya ternak perah, *S. aureus* merupakan agen utama penyebab radang ambing atau mastitis yang bersifat *contagious* dengan tingkatan infeksi subklinis, klinis ataupun kronik (Bari *et al.*, 2022). Penyakit mastitis sendiri mempunyai dampak ekonomi yang luas bagi peternak perah di seluruh dunia (Zhang *et al.*, 2022^a). Selain infeksi pada manusia dan hewan, *S. aureus* juga diketahui dapat menyebabkan keracunan makanan pada manusia akibat mengonsumsi makanan asal produk hewan seperti daging dan susu yang terkontaminasi enterotoksin *S. aureus* (Ono *et al.*, 2019). Gejala klinis keracunan makanan tersebut dapat berupa mual, muntah hebat, kram perut, dengan atau tanpa diare (Chen & Xie, 2019).

Pengobatan infeksi *S. aureus* umumnya menggunakan antibiotik golongan β-laktam, tetrasiklin, aminoglikosida, dan quinolon (Lee *et al.*, 2022; Lubna *et al.*, 2023). Namun yang terjadi, resistensi *S. aureus* terhadap agen antimikroba merupakan masalah global yang semakin meningkat (Gonçalves *et al.*, 2023; Ivanovic *et al.*, 2023). Penggunaan antibiotik β-laktam dan tetrasiklin pada pengobatan infeksi *S. aureus* pada hewan telah banyak dilaporkan sebelumnya (Karimi & Momtaz, 2022; Silva *et al.*, 2023; Sipahi *et al.*, 2023). Namun demikian, resistensi *S. aureus* terhadap 2 golongan tersebut juga telah dilaporkan (Pérez *et al.*, 2020; Suwito

et al., 2022; Zhang *et al.*, 2022^b). Sifat resistensi *S. aureus* terhadap β-laktam disandi oleh gen *blaZ*, sedangkan tetrasiklin yaitu gen *tet* (Bruce *et al.*, 2022; Lubna *et al.*, 2023; Nuñez *et al.*, 2023). Uji sensitivitas antibiotik maupun identifikasi gen penyebab resisten diperlukan tidak hanya untuk terapi yang efektif tetapi juga untuk pemantauan penyebaran strain resisten (Emaneini *et al.*, 2013).

Salah satu uji sensitivitas antibiotik pada isolat asal hewan yang banyak digunakan di Indonesia adalah metode *disk diffusion* (Kirby Bauer), namun metode ini hanya menentukan sifat resistensi bakteri berdasarkan diameter zona hambat dan kemudian dibandingkan dengan standar referensi untuk menentukan interpretasinya (Aziz *et al.*, 2016; Algammal *et al.*, 2020; Aziz *et al.*, 2022; Suwito *et al.*, 2022). Dilain hal, uji sensitivitas menggunakan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) selain dapat mengetahui sifat resistensi seperti metode Kirby Bauer, namun memiliki kelebihan dapat menentukan berapa konsentrasi minimal antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh bakteri (Kahlmeter *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter fenotipik (Kirby Bauer dan MIC) isolat *S. aureus* yang resisten dan non resisten berdasarkan identifikasi gen *blaZ*, *tetK*, dan *tetM*. Determinasi MIC pada isolat resisten, diharapkan memberikan informasi penting bagi tenaga medis kesehatan hewan dalam menentukan strategi pengobatan.

Materi dan Metode

Isolat Bakteri dan ekstraksi DNA

Penelitian ini menggunakan koleksi 8 isolat *S. aureus* dari penelitian sebelumnya (Maulina, 2022; Putri, 2023; Setyorini, 2023). Isolat tersebut ditumbuhkan dari stok gliserol -80°C pada media Trypticase Soya Agar (TSA)

(Oxoid, England). Konfirmasi ulang *S. aureus* dilakukan dengan ekstraksi DNA dari biak murni pada TSA menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan). Lima sampai sepuluh koloni tunggal dikumpulkan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml yang berisi 200 µl Gram+ buffer. Sebanyak 5 µl Lysostaphin (5 mg/ml) (Sigma, USA) ditambahkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Dinding sel *S. aureus* dilisis sempurna menggunakan 200 µl buffer GB kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Sebanyak 200 µl etanol absolut ditambahkan ke dalam campuran dan divortex. DNA dalam campuran diikat ke matriks kolom GD dengan cara disentrifugasi pada 14.000 x g selama 1 menit. Kontaminan DNA dicuci menggunakan 400 µl W1 buffer dan 600 µl wash buffer dengan sentrifugasi pada 14.000 x g selama 1 menit. Kolom disentrifugasi lagi selama 3 menit pada 14.000 x g untuk mengeringkan matriks kolom. Terakhir, DNA dielusi dalam 50 µl elution buffer dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Identifikasi molekuler *S. aureus*, gen resisten β-laktam dan tetrasiklin

Isolat *S. aureus* dari stok gliserol dikonfirmasi dengan gen target 23S rRNA yang spesifik spesies *S. aureus* (Straub *et al.*, 1999). Determinasi genotipik sifat resisten terhadap β-laktam dilakukan dengan deteksi gen *blaZ* (Martineau *et al.*, 2000), sedangkan terhadap tetrasiklin dengan deteksi *tetK* atau *tetM* (Strommenger *et al.*, 2003). Amplifikasi gen target dilakukan dengan membuat campuran PCR sebanyak 25 µl yang terdiri dari 5 µl mastermix (5X PCR Master Dye

Mix, ExcelTaq, SMOBIO, Taiwan), 1 µl primer *forward* (10 pmol/µl), 1 µl primer *reverse* (10 pmol/µl), 16 µl DDH₂O, dan 2 µl DNA *template*. Primer yang digunakan tertera pada Tabel 1, dan semuanya dibeli dari IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Singapura). Campuran PCR kemudian dihomogenkan dan disentrifus beberapa detik lalu PCR *tube* dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (SelectCycler II Thermal Cycler, Select BioProducts, USA) dengan program PCR seperti pada Tabel 1.

Hasil amplifikasi PCR diseparasi menggunakan 1,5% gel agarose (HiMedia, India) dalam Tris-borate-EDTA (TBE) buffer dan FluoroVue DNA *staining* (SMOBIO, Taiwan). Larutan TBE buffer dibuat manual dengan konsentrasi final 89 mM Tris (pH 7.6) (Tris Base, Sigma, USA), 89 mM boric acid (Sigma, USA), dan 2 mM EDTA (HiMedia, India). Gel berisi produk PCR dan 100 bp DNA *ladder* (AccuBand, SMOBIO, Taiwan) kemudian dielektroforesis menggunakan *submarine electrophoresis system* (Mupid-exU, Jepang) dengan tegangan 135 volt selama 20 menit. Keberadaan produk PCR divisualisasi dengan LED *Transilluminator* (BIO-HELIX, Taiwan). Pita DNA yang muncul kemudian dibandingkan dengan DNA *ladder*.

Uji Resistensi Kirby Bauer

Uji resistensi terhadap antibiotik menggunakan metode Kirby Bauer mengacu pada *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) versi 11.1 (2012). Sifat resistensi terhadap golongan β-laktam dideteksi menggunakan *disk* penisilin (10µg), sedangkan untuk golongan tetrasiklin menggunakan tetrasiklin (30µg). Kedua jenis *disk* diperoleh dari Oxoid (England). Isolat yang akan diuji ditanam pada

Tabel 1. Target gen dan sekuen primer yang digunakan untuk proses amplifikasi.

Gen	Sekuen DNA	Annealing (°C)	Ukuran (bp)	Referensi
23S rRNA <i>S. aureus</i>	5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3'	64	1250	(Straub <i>et al.</i> , 1999)
	5'-AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC-3'			
<i>blaZ</i>	5'-ACTTCAACACCTGCTGCTTTC-3'	61	173	(Martineau <i>et al.</i> , 2000)
	5'-TGACCACTTTTATCA GCAACC-3'			
<i>tetK</i>	5'-GTAGCGACAATAGGTAATAGT-3'	55	360	(Strommenger <i>et al.</i> , 2003)
	5'-GTAGTGACAATAAACCTCCTA-3'			
<i>tetM</i>	5'-AGTGGAGCGATTACAGAA-3'	55	158	(Strommenger <i>et al.</i> , 2003)
	5'-CATATGTCCTGGCGTGTCTA-3'			

media Brain Heart Infusion (BHI) broth (Merck, Germany) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-14 jam, setelah itu sebanyak 100 µl suspensi (konsentrasi 0,5 McFarland) disebar pada media Mueller Hinton Agar (MHA) (Himedia, India) menggunakan spatula segitiga steril. *Disk* antibiotik diletakkan di atas permukaan media MHA menggunakan pinset steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona terang yang terbentuk, diukur dengan jangka sorong, kemudian sifat resistensi diinterpretasi dengan diameter standar (Lubna et al., 2023).

Determinasi *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

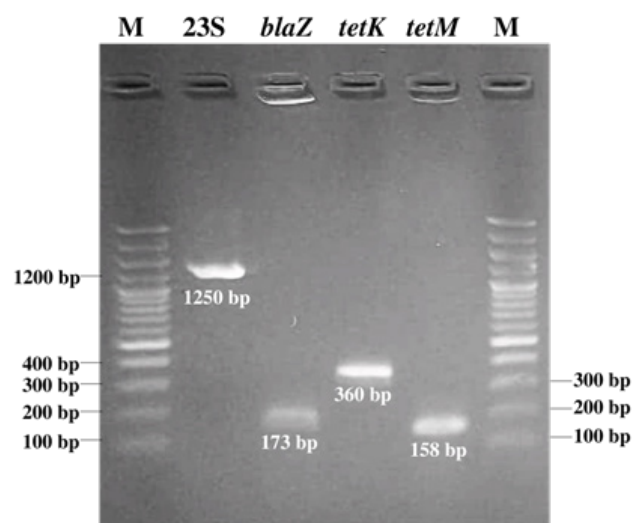
Determinasi konsentrasi terkecil dari antibiotik untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri dilakukan dengan uji MIC (Kahlmeter et al., 2006). Isolat yang diuji ditanam pada BHI broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 jam, selanjutnya dilakukan pengenceran dalam Mueller Hinton Broth (MHB) (Himedia, India) steril hingga didapatkan standar kekeruhan 0,5 McFarland. Sebanyak 100 µl MHB steril dimasukkan ke dalam semua sumuran 96 well plate steril (Biologix, China). Kemudian dimasukkan 100 µl antibiotik ampisilin (Ampicillin Sodium Salt, Sigma Aldrich, USA) atau oksitetrasiklin (Oxytetracycline Hydrochloride, Sigma Aldrich, USA) dengan konsentrasi 512 µg/ml ke dalam sumuran *line* 1 untuk mendapatkan konsentrasi 256 µg/ml. Selanjutnya dilakukan dilusi bertingkat dengan metode *two fold dilution* hingga didapatkan konsentrasi akhir 0.125 µg/ml pada *line* 11. Sebanyak 10 µl isolat dengan standar 0,5 McFarland yang disiapkan sebelumnya kemudian ditambahkan ke dalam tiap sumuran secara duplo, termasuk kontrol negatif antibiotik (*line* 12). Tutup sumuran dengan *lid* dan plastik *wrap* untuk mencegah evaporasi saat inkubasi 37°C, 24 jam. Sumuran terakhir yang tidak mengalami kekeruhan, dinyatakan sebagai MIC. Sifat resistensi terhadap golongan β-laktam pada uji MIC ini menggunakan ampisilin, seperti pada penelitian sebelumnya (Ferreira et al., 2017). Interpretasi resistensi mengacu pada *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) versi 13.0 (2023).

Analisis statistik

Data penelitian dianalisis menggunakan *R software* versi 4.2.2 (*Comprehensive R Archive Network*, Vienna, Austria). Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk normality test* dan Q-Q plot. Uji *pearson correlation coefficient* (r) atau *spearman's rho* (r_s) digunakan untuk mengetahui korelasi antara diameter hasil uji Kirby Bauer dengan level MIC. Hasil analisis statistik diinterpretasikan dengan nilai signifikan apabila P-value di bawah 0.05 ($p < 0.05$), sedangkan kekuatan hubungan antara diameter uji Kirby Bauer (X) dan MIC (Y) diinterpretasikan dengan koefisien korelasi.

Hasil dan pembahasan

Hasil PCR menunjukkan 8 isolat yang ditumbuhkan dari stok gliserol dalam penelitian ini merupakan spesies *S. aureus* (Gambar 1), ditunjukkan dengan pita *band* berukuran 1250 bp yang sesuai dengan penelitian sebelumnya (Aziz et al., 2020). Selanjutnya, deteksi sifat resistensi secara genotipik menunjukkan 4 isolat dengan kode C, D, F dan TLK tidak mempunyai gen resisten (*blaZ*, *tetK*, dan *tetM*). Isolat DMG dan J menunjukkan positif terhadap gen penyandi beta-laktam (*blaZ*⁺), sedangkan isolat PGT dan KRG positif terhadap β-laktam dan tetrasiklin (*blaZ*⁺, *tetK*⁺/*tetM*⁺). Produk PCR pada perwakilan isolat dengan karakter *blaZ*⁺, *tetK*⁺, dan *tetM*⁺ tersaji pada Gambar 1. Sesuai



Gambar 1. Visualisasi produk PCR untuk deteksi spesies *S. aureus* dan gen resisten β-laktam dan tetrasiklin. Representasi produk PCR isolat PGT digunakan untuk 23S, *blaZ* dan *tetK*, sedangkan KRG untuk *tetM*.

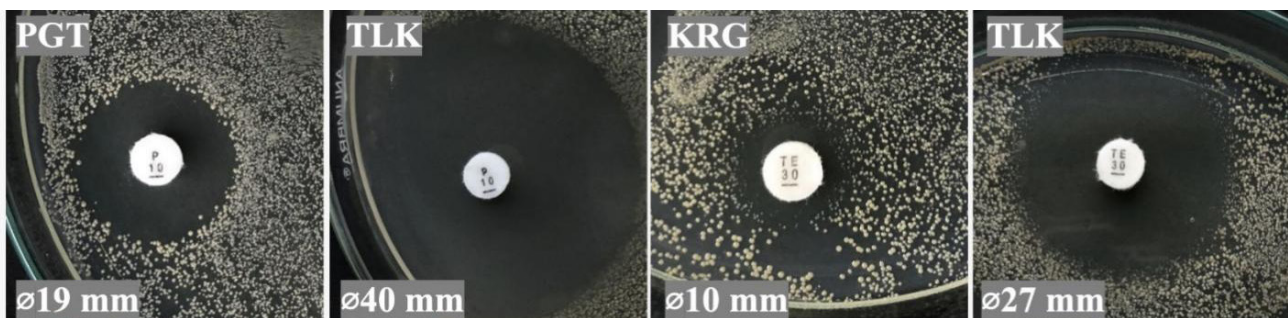
referensi, gen *blaZ* ditunjukkan dengan ukuran produk PCR 173 bp, *tetK* 360 bp, dan *tetM* 158 bp (Gambar 1).

Determinasi gen resisten dengan teknik molekuler, menunjukkan korelasi yang kuat dengan hasil uji fenotipik menggunakan metode Kirby Bauer dan MIC. Isolat C, D, F, dan TLK dengan genotipik *blaZ*, *tetK*, dan *tetM* memperlihatkan interpretasi sensitif pada uji Kirby Bauer (Gambar 2). Diketahui untuk 4 isolat tersebut, diameter zona terang pada *disk* penisilin lebih dari 26 mm dan tetrasiklin lebih dari 22 mm, sehingga diinterpretasikan mempunyai sifat sensitif pada kedua antibiotik yang digunakan. Interpretasi MIC juga menunjukkan hal yang sama dengan Kirby Bauer, diketahui isolat C, D, F, dan TLK dihambat pertumbuhannya pada konsentrasi 0.125 µg/ml ampisilin dan di bawah 1 µg/ml untuk oksitetrasiklin, sehingga dinyatakan sensitif sesuai acuan standar EUCAST (Tabel 2). Berbeda dengan 4 isolat di atas, isolat DMG, J, PGT, dan KRG mempunyai sifat resisten pada satu atau dua antibiotik yang diuji. Diketahui mayoritas (7/8) isolat mempunyai interpretasi sifat resistensi yang sama pada uji molekuler dengan metode Kirby Bauer dan MIC. Isolat J mempunyai MIC yang tinggi pada kedua jenis antibiotik, diketahui 32 µg/ml terhadap ampisilin dan 256 µg/ml terhadap oksitetrasiklin Gambar 2. Hal menarik pada penelitian ini diketahui isolat J dengan genotipik *tetK* dan *tetM*, namun mempunyai fenotipik resisten terhadap golongan tetrasiklin. Selain itu, penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan level MIC pada isolat dengan karakter resistensi dari interpretasi Kirby Bauer dan atau gen resisten. Isolat J dan KRG mempunyai level MIC ampisilin 16 kali lebih tinggi (32/2) dibanding DMG dan PGT. Hal yang sama juga

terlihat pada MIC tetrasiklin, isolat J dan PGT 8 kali lebih tinggi (256/32) dari KRG.

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa variabel diameter tetrasiklin, MIC tetrasiklin dan MIC β-laktam tidak terdistribusi normal, sehingga pendekatan uji *spearman's rho* (r_s) dipilih untuk analisis statistik. Selanjutnya analisis *spearman's rho* (r_s) menunjukkan bahwa koefisien korelasi *rho* (r_s) antara diameter uji Kirby Bauer (X) dan MIC (Y) pada β-laktam sebesar -0.93, sedangkan tetrasiklin -0.94 (Gambar 3). Koefisien ini menunjukkan adanya hubungan negatif yang kuat antara kedua variabel tersebut. Selain itu, uji statistik *spearman's rho* (r_s) menghasilkan nilai p pada β-laktam sebesar < 0.00077 (Gambar 3A) dan tetrasiklin sebesar <0.00043 (Gambar 3B). Nilai *P-value* <0.05 tersebut menunjukkan bahwa ada bukti yang signifikan antara hubungan korelasi dari diameter Kirby Bauer (X) dengan MIC (Y). Hal ini menunjukkan bahwa semakin kecil diameter uji Kirby Bauer, maka nilai MIC cenderung lebih tinggi. Temuan ini konsisten dengan asumsi bahwa semakin kecil diameter pada uji Kirby Bauer, semakin tinggi konsentrasi (µg/ml) antibiotik yang dibutuhkan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Meskipun jenis antibiotik yang digunakan pada metode Kirby Bauer (penisilin) dan MIC (ampisilin) dalam penelitian ini berbeda, namun resistensinya keduanya disandi oleh gen yang sama, yaitu *blaZ*. Gen *blaZ* terkait erat dengan munculnya resistensi terhadap semua golongan β-laktam seperti penisilin, ampisilin, amoksilin, dan sebagainya (Ivanovic *et al.*, 2023). β-laktamase adalah enzim yang diproduksi oleh bakteri yang dapat menghidrolisis cincin β-laktam, menyebabkan antibiotik β-laktam menjadi nonaktif (Feyissa *et al.*, 2023).

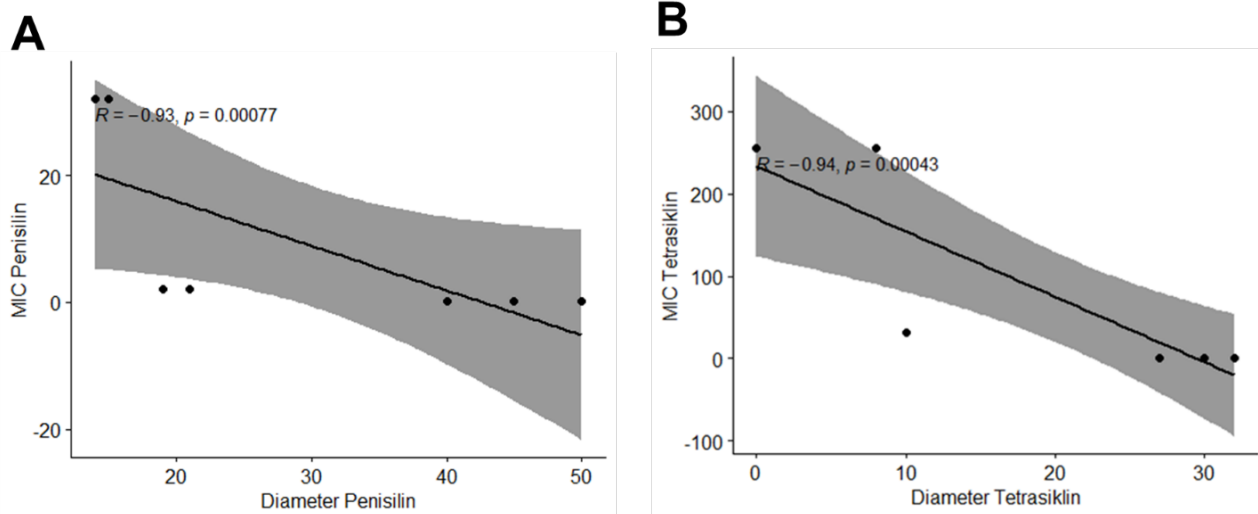


Gambar 2. Hasil uji Kirby Bauer perwakilan isolat *S. aureus* terhadap penisilin dan tetrasiklin. Kode isolat dan diameter zona terang ditunjukkan dalam gambar.

Tabel 2. Informasi isolat *S. aureus* dan hasil uji fenotipik dan genotipik sifat resistensi antibiotik.

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Genotipik Resisten	Fenotipik Resisten	Kirby Bauer (mm)				MIC (µg/ml)	
					P10		TE30		Ampisilin R: >0.125	Oksitetrasiklin R: >1
					R: <26	S: ≥26	R: <22	S: ≥22		
1	C	Susu Kambing Mastitis	-	-	40 (S)		32 (S)		< 0.125	< 0.125
2	D	Susu Kambing Mastitis	-	-	50 (S)		30 (S)		< 0.125	< 0.125
3	F	Susu Kambing Mastitis	-	-	45 (S)		30 (S)		< 0.125	< 0.125
4	TLK	Daging Ayam Segar	-	-	40 (S)		27 (S)		< 0.125	0.5
5	DMG	Daging Ayam Segar	<i>blaZ</i>	Penisilin	21 (R)		30 (S)		2	0.25
6	J	Susu Kambing Mastitis	<i>blaZ</i>	Penisilin dan Tetrasiklin	15 (R)		8 (R)		32	256
7	PGT	Daging Ayam Segar	<i>blaZ, tetK</i>	Penisilin dan Tetrasiklin	19 (R)		0 (R)		2	256
8	KRG	Daging Ayam Segar	<i>blaZ, tetM</i>	Penisilin dan Tetrasiklin	14 (R)		10 (R)		32	32

Ket: Grayscale menunjukkan isolat dengan interpretasi resisten.



Gambar 3. Scatterplot dari hasil uji spearman's rho (r_s) dengan koefisien korelasi rho (r_s) dan nilai P-value antara diameter dengan MIC dua antibiotik β -laktam (A) dan tetrasiklin (B).

Beberapa β -laktam terletak pada *mobile genetic element* seperti plasmid, sedangkan yang lain pada kromosom. Produksi β -laktamase diketahui salah satu mekanisme resistensi yang paling penting secara klinis untuk *S. aureus* dan banyak jenis bakteri patogen (Neelam et al., 2022; Sipahi et al., 2023).

Determinasi gen resisten tetrasiklin menggunakan *tetK* dan *tetM* telah dilaporkan sebelumnya (Aziz et al., 2016; Rusenova et al., 2022), namun penelitian ini (isolat J) memperlihatkan bahwa deteksi berbasis *tetK* dan

tetM tidak cukup. Tetrasiklin adalah antibiotik spektrum luas yang digunakan dalam pengobatan dan pencegahan infeksi berbagai jenis bakteri (Qamar et al., 2023). Bakteri yang resisten terhadap tetrasiklin umumnya mempunyai gen yang resisten terhadap tetrasiklin (*tet*) (Silva et al., 2023). *Staphylococcus aureus* diketahui mempunyai dua mekanisme utama resistensi terhadap tetrasiklin yaitu: *active efflux*, dihasilkan dari akuisisi gen *tetK* dan *tetL* yang terletak di plasmid dan perlindungan ribosom oleh *elongation factor-like proteins*, disandi oleh

tetM atau *tetO* yang terletak di dalam kromosom atau transposon (Emaneni *et al.*, 2013; Martini *et al.*, 2017; Bruce *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023). Oleh karena itu, deteksi gen *tet* yang komprehensif perlu dilakukan, tidak hanya *tetK* dan *tetM*, namun juga terhadap *tetL* dan *tetO*.

Meskipun karakter resistensi isolat dapat ditunjukkan dengan determinasi gen resisten dan Kirby Bauer, namun MIC dapat memberikan informasi kuantitatif konsentrasi daya hambat antibiotik yang diuji. Informasi MIC sangat berharga bagi tenaga kesehatan dalam menentukan tindakan pengobatan yang tepat. Isolat J dan KRG pada penelitian ini menunjukkan MIC terhadap ampisilin sebesar 32 µg/mg. Selanjutnya terhadap tetrasiklin, isolat J dan PGT menunjukkan MIC sebesar 256 µg/ml yang artinya 256 kali lebih tinggi dibanding standar isolat non resisten (<1 µg/ml). Isolat J tersebut menunjukkan level resistensi yang tinggi bila dibandingkan dengan penelitian resistensi isolat asal hewan yang dilakukan sebelumnya (Oliveira *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2014; Martini *et al.*, 2017). Isolat dengan level MIC yang tinggi perlu perhatian khusus (Lazou & Chaintoutis, 2023). Bakteri dengan level MIC yang tinggi lebih sulit ditangani dan lebih berbahaya dibanding MIC rendah (Lubna *et al.*, 2023). Pemahaman karakter resistensi secara komprehensif baik secara fenotipik (kualitatif dan kuantitatif) dan genotipik pada *S. aureus* dan bakteri patogen lainnya dapat membantu tenaga kesehatan dalam interpretasi *susceptibility*, pengambilan keputusan tindakan terapeutik, dan strategi pengendalian infeksi.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan hubungan gen resisten dengan hasil uji fenotipik menggunakan metode Kirby Bauer dan MIC. Empat isolat yang tidak memiliki gen resisten menunjukkan interpretasi sensitif pada hasil uji Kirby Bauer dan MIC. Sebaliknya isolat DMG, J, PGT, dan KRG mempunyai sifat resisten pada satu atau dua antibiotik yang diuji baik secara fenotipik maupun genotipik (*blaZ*⁺, *tetK*⁺/*tetM*⁺). Pada penelitian ini diketahui level MIC beberapa isolat tersebut tergolong tinggi. Isolat J dan KRG mempunyai level MIC ampisilin sebesar 32 µg/ml, sedangkan isolat J dan PGT sebesar

256 µg/ml terhadap oksitetrasiklin. Meskipun identifikasi gen resisten dan Kirby Bauer dapat mengetahui karakter resistensi bakteri, namun determinasi MIC perlu dilakukan untuk memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif bagi tenaga kesehatan dalam pengambilan keputusan tindakan terapeutik dan strategi pengendalian infeksi.

Daftar Pustaka

- Algammal, A.M., Enany, M.E., El-Tarabili, R.M., Ghobashy, M.O.I. and Helmy, Y.A. (2020). Prevalence, Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence and Enterotoxins-Determinant Genes of MRSA Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Egypt. *Pathogens*. 9 (5): 362.
- Aziz, F., Hisatsune, J., Yu, L., Kajimura, J., Sato'o, Y., Ono, H.K., Masuda, K., Yamaoka, M., Salasia, S.I.O., Nakane, A., Ohge, H., Kusunoki, Y. and Sugai, M. (2020). *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor Va-Specific Expansion of T Cells. *Infection and Immunity*. 88 (2): e00360-19.
- Aziz, F., Lestari, F.B., Indarjulianto, S. and Fitriana, F. (2022). Identifikasi dan Karakterisasi Resistensi Antibiotik Terduga *Staphylococcus aureus* pada Susu Mastitis Subklinis asal Sapi Perah di Kelompok Ternak Sedyo Mulyo, Pakem, Sleman Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*. 12 (1): 66–74.
- Aziz, F., Lestari, F.B., Nuraidah, S., Purwati, E. and Salasia, S.I.O. (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): 60–69.
- Aziz, F., Lestari, F.B., Nuraida, S., Purwati, E. and Salasia, S.I.O. (2020). Deteksi *Staphylococcus aureus* dan

- Staphylococcus* sp. Secara Langsung Dari Susu Segar Kambing Peranakan Etawa dengan Teknik PCR. *Jurnal Sain Veteriner*. 38 (2): 168–174.
- Bari, M.S., Rahman, Md.M., Persson, Y., Derks, M., Sayeed, Md.A., Hossain, D., Singha, S., Hoque, Md.A., Sivaraman, S., Fernando, P., Ahmad, I., Samad, A. and Koop, G. (2022). Subclinical mastitis in dairy cows in south-Asian countries: a review of risk factors and etiology to prioritize control measures. *Veterinary Research Communications*. 46 (3): 621–640.
- Bruce, S.A., Smith, J.T., Mydosh, J.L., Ball, J., Needle, D.B., Gibson, R. and Andam, C.P. (2022). Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts. *Scientific Reports*. 12(1): 4413.
- BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, version 11.1 (2012). British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Birmingham, United Kingdom.
- Chen, Q. and Xie, S. (2019). Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China. *Toxins*. 11 (6): 307.
- Emaneni, M., Bigverdi, R., Kalantar, D., Soroush, S., Jabalameli, F., Noorazar Khoshgnab, B., Asadollahi, P. and Taherikalani, M. (2013). Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 26 (2): 76–80.
- EUCAST. 2023. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) version 13.0. *Clinical breakpoints*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
- Ferreira, A.M., Martins, K.B., Silva, V.R.da, Mondelli, A.L. and Cunha, M.de L.R.de S.da. (2017). Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48 (1): 159–166.
- Feyissa, N., Alemu, T., Jirata Birri, D., Desalegn, A., Sombo, M. and Abera, S. (2023). Isolation and Determination of Antibacterial Sensitivity Characteristics of *Staphylococcus aureus* from Lactating Cows in West Shewa Zone, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*. 2023:1–12.
- Gonçalves, J.L., Lee, S.H.I., Camargo, C.H., Zanella, R.C., Silva, N.C.C., Rall, V.L.M., Cue,R.I. and dos Santos, M.V. (2023). Molecular characterization of persistent subclinical mastitis-causing *Staphylococcus aureus* from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1-9.
- Ivanovic, I., Boss, R., Romanò, A., Guédon, E., Le-Loir, Y., Luini, M. and Graber, H.U. (2023). Penicillin resistance in bovine *Staphylococcus aureus*: Genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods. *Journal of Dairy Science*. 106 (1): 462–475.
- Kahlmeter, G., Brown, D.F.J., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Soriano, F. and Stetsiouk, O. (2006). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. 12 (6): 501–503.
- Karimi, S. and Momtaz, H. (2022). Molecular Typing, Phenotypic and Genotypic Assessment of Antibiotic Resistance and Virulence Factors amongst the *Staphylococcus aureus* Bacteria Isolated from Raw Chicken Meat. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 37 (4): 226–241.
- Kitagawa, H., Ohge, H., Hisatsune, J., Kajihara, T., Katayama, K., Takahashi, S., Sueda, T. and Sugai, M. (2019). Prosthetic valve endocarditis caused by ST8 SCCmecIV type community-associated methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine*. 58 (5): 743–747.
- Lazou, T. P. and Chaintoutis, S. C. (2023). Comparison of disk diffusion and broth microdilution methods for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* isolates of meat origin. *Journal of Microbiological Methods*. 204: 106649.
- Lee, G.Y., Lee, S.I., Kim, S.D., Park, J.H., Kim, G.B. and Yang, S.J. (2022). Clonal distribution and antimicrobial resistance of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from broiler farms, slaughterhouses, and retail chicken meat. *Poultry Science*. 101 (10): 102070.
- 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 (4): 673.
- Martineau, F., Picard, F.J., Lansac, N., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (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.
- Martini, C.L., Lange, C.C., Brito, M.A., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C. and Vaz, E.K. (2017). Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Dairy Research*. 84(2): 202–205.
- Maulina, T. R. (2022). Metode Identifikasi *Staphylococcus aureus* pada Susu Kambing Mastitis di Kecamatan Samigaluh, Kulonprogo. *Proyek Akhir. Program Studi Teknologi Veteriner Sekolah Vokasi Universitas Gadjah Mada*. Yogyakarta.
- McDougall, S., Hussein, H. and Petrovski, K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand Veterinary Journal*. 62 (2): 68–76.
- Miyake, R., Iwamoto, K., Sakai, N., Matsunae, K., Aziz, F., Sugai, M., Takahagi, S., Tanaka, A. and Hide, M. (2022). Uptake of *Staphylococcus aureus* by keratinocytes is reduced by interferon–fibronectin pathway and filaggrin expression. *The Journal of Dermatology*. 49 (11): 1148–1157.
- Neelam, Jain, V.K., Singh, M., Joshi, V.G., Chhabra, R., Singh, K. and Rana, Y.S. (2022). Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle. *PLOS ONE*. 17 (5): e0264762.
- Nuñez, K.V.M., da Silva Abreu, A.C., Gonçalves, J.L., dos Santos, M.V., de Oliveira Rocha, L. and Cirone Silva, N.C. (2023). Virulence and antimicrobial resistance genes profiles of *spa* type t605 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Journal of Applied Microbiology*. 134 (4).
- Oliveira, L., Langoni, H., Hulland, C. and Ruegg, P.L. (2012). Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 95 (4): 1913–192.
- Ono, H.K., Hirose, S., Narita, K., Sugiyama, M., Asano, K., Hu, D.L. and Nakane, A. (2019). Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. *PLOS Pathogens*. 15 (5): e1007803.
- Pérez, V.K.C., Custódio, D.A.C., Silva, E.M.M., de Oliveira, J., Guimarães, A.S., Brito, M.A.V.P., Souza-Filho, A.F., Heinemann, M.B., Lage, A.P. and Dorneles, E.M.S. (2020). Virulence factors and antimicrobial

- resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51 (4): 2111–2122.
- Putri, S. A. (2023). Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus* sp. dan *Staphylococcus aureus* dari Sampel Daging Ayam yang Dijual di Sepuluh Pasar Wilayah Kota Yogyakarta. *Proyek Akhir*. Program Studi Teknologi Veteriner Sekolah Vokasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Qamar, M.U., Aatika, Chughtai, M.I., Ejaz, H., Mazhari, B.BZ., Maqbool, U., Alanazi, A., Alruwaili, Y. and Junaid, K. (2023). Antibiotic-Resistant Bacteria, Antimicrobial Resistance Genes, and Antibiotic Residue in Food from Animal Sources: One Health Food Safety Concern. *Microorganisms*. 11 (1): 161.
- Rusenova, N., Vasilev, N., Rusenov, A., Milanova, A. and Sirakov, I. (2022). Comparison between Some Phenotypic and Genotypic Methods for Assessment of Antimicrobial Resistance Trend of Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates from Bulgaria. *Veterinary Sciences*. 9 (8): 401.
- Setyorini, D. R. (2023). Studi Pendahuluan Deteksi *Staphylococcus* sp. dan *Staphylococcus aureus* pada Daging Ayam Segar dari Pasar Tradisional. *Proyek Akhir*. Program Studi Teknologi Veteriner Sekolah Vokasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Silva, V., Araújo, S., Monteiro, A., Eira, J., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., Lemsaddek, T. S. and Poeta, P. (2023). *Staphylococcus aureus* and MRSA in Livestock: Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages. *Microorganisms*. 11 (1): 124.
- Sipahi, N., Kaya, E., Çelik, C. and Pınar, O. (2023). The Characterization and Beta-Lactam Resistance of Staphylococcal Community Recovered from Raw Bovine Milk. *Antibiotics*. 12 (3). 556.
- Straub, J.A., Hertel, C. and Hammes, W.P. (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. and 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.
- Suwito, W., Nugroho, W.S., Adji, R. S., Andriani, A., Kusumaningtyas, E. and Martini, T. (2022). Phenotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* from subclinical mastitis in Etawah-crossbreed goats in Yogyakarta, Indonesia. *Veterinary World*. 15 (11): 2587–2592.
- Thomas, S., Liu, W., Arora, S., Ganesh, V., Ko, Y.P. and Höök, M. (2019). The Complex Fibrinogen Interactions of the *Staphylococcus aureus* Coagulases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9: 106.
- Zhang, J., Wang, J., Jin, J., Li, X., Zhang, H., Shi, X. and Zhao, C. (2022)^a. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Food Research International*. 162: 111969.
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, X., Wang, X. and Li, H. (2022)^b. Detection of Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Drug Resistance Gene of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. *Microbiology Spectrum*. 10 (4).