

# ISOLASI *NOCARDIA* SP. DARI SUATU KASUS MASTITIS PADA SAPI PERAH

DJAENUDIN GHOLIB, SUKARDI HASTIONO, SUDARISMAN,  
PADERI ZAHARI dan LILY NATALIA

Balai Penelitian Penyakit Hewan, Bogor

## ABSTRACT

*Nocardia* sp. was isolated from a dairy cow which clinically diagnosed as suffering from mastitis. The cow was said to have been infected for three days had not received any treatment. The identification of *Nocardia* sp. was made by means of macroscopic and microscopic examinations and biochemical tests of the culture. This is the first report of the isolation of *Nocardia* sp. from a cow in Indonesia.

## PENDAHULUAN

*Nocardia* sp. sebagai penyebab penyakit pada berbagai jenis hewan telah banyak dilaporkan oleh para peneliti terdahulu, antara lain Cross dkk. (1953), Thordal-Christensen dan Clifford (1953), Blake (1954), Awad (1960), Kinch (1968), Iyer dan Rao (1971), Deem dan Harrington (1980) dan Parnell dkk. (1983). Spesiesnya pun telah banyak pula ditemukan, sehingga Tsukamura (1969) dan Kwapinski dan Horsman (1973) dapat menyusun taksonominya berdasarkan pengelompokan menurut kriteria yang menjadi pegangan mereka masing-masing.

Penyakit atau gangguan yang disebabkan oleh genus *Nocardia* ini disebut *nocardiosis* atau *infeksi nokardial* (Deem & Harrington, 1980), dan gangguan mastitis merupakan salah satu bentuk gangguan di antara sekian banyak nokardiosis ini. Di samping itu, gangguan mastitis oleh nokardia ini merupakan juga salah dari *mastitis mikotik* (disebut juga *mastitis aktinomikotik*) pada ternak, yang tentu saja dapat dibedakan dari mastitis lain oleh bakteri, yang sehari-harinya biasa disebut *mastitis bakterial*. Kedua kelompok mastitis ini, yakni mastitis bakterial dan mastitis mikotik, pada sapi perah dikenali dengan sebutan mastitis bovin (Hastiono dkk., 1983).

Kasus infeksi nokardial pada ambung sapi perah telah lama dilaporkan orang. Evans (1918) telah melaporkan kejadian mastitis nokardial dan mengisolasi penyebabnya dari contoh air susu. Kemudian, Munch-Petersen (1954) menguraikan suatu kasus alamiah mastitis aktinomikotik pada sapi beserta percobaan tiruannya yang dia lakukan pada sapi lain dengan *Nocardia asteroides* sebagai penyebabnya. Percobaan serupa dilakukan pula oleh Pier dkk. (1961). Di Australia, mastitis nokardial telah dilaporkan berturut-turut oleh Johnston dan Connole (1962), Bruhl (1963) dan Eales dkk. (1964). Sementara itu, Awad (1960), di Sudan, menemukan infeksi *Nocardia* pada ambung dan testes sapi.

Di antara spesies *Nocardia* itu sendiri, demikian pula di antara spesies *Actinomycetes* yang mirip *Nocardia* — kedua genus itu termasuk bangsa *Actinomycetales* — serta beberapa spesies bakteri besar lainnya, terdapat persamaan dan perbedaan dengan *Nocardia asteroides*. Oleh karena itu, para peneliti pun mempelajari persamaan dan perbedaan di antara spesies-spesies ini melalui studi perbandingan sifat-sifat biologik, kultural dan biokimianya (Gordon & Mihm, 1957; Schneidau & Shaffer, 1957; Bojalil & Cerbon, 1959; Georg dkk., 1961; dan Kwapinski & Horsman, 1973).

Dalam tulisan ini, untuk pertama kalinya para penulis melaporkan isolasi *Nocardia* sp. dari suatu kasus yang diduga mastitis mikotik pada seekor sapi perah Friesian-Holstein, yang menurut anamnesis, baru tiga hari menderita sakit dan belum pernah mendapat pengobatan apapun selama sakit.

## BAHAN DAN CARA

Contoh air susu dari hasil survei mastitis di Jawa Tengah (Hastiono dkk., 1983), dipergunakan sebagai bahan dalam penelitian ini. Bahan tersebut sebelumnya telah diambil secara aseptik dari kuarter ambung sapi yang sakit, yang terlebih dahulu dicuci dengan air sabun dan dibersihkan dengan alkohol.

Contoh air susu tersangka mastitis mikotik ini kemudian diperiksa dan diuji secara kultural dan biokimia menurut pedoman yang dikemukakan baik oleh Ajello dkk. (1963), Slack dan Gerencser (1975) maupun Al-Doory (1980). Uji patogenitas terhadap isolat belum dilakukan dalam penelitian ini.

## HASIL

### 1. Pemeriksaan Kultural :

#### a) Makroskopik :

Pembiakan dalam agar glukose/dekstrose Sabouraud memperlihatkan adanya pertum-

buhan koloni yang lambat, berwarna krim kekuningan, permukaannya keriput dan tidak menonjol. Setelah koloni kurang lebih berumur satu minggu, warna medium berubah menjadi merah muda, sedangkan setelah koloni berumur tua, medium menjadi berwarna coklat tua dan akhirnya kuning keruh.

b) **Mikroskopik :**

Pemeriksaan mikroskopik baik natif terhadap contoh air susu maupun terhadap koloni biakan, memperlihatkan adanya gambaran khas dari kelompok *Nocardia sp.* ini, yaitu berupa miselium yang bercabang-cabang dan berfragmentasi berbentuk bakteri. Dalam pewarnaan Gram, kelompok mikro-organisme ini bersifat Gram positif (Gambar 1 dan 2), sedangkan dalam pewarnaan tahan-asam bersifat tahan-asam sebagian (parsial).

2. Uji Biokimiawi :

a). Uji hidrolisis :

- 1). **Hidrolisis kasein :** Isolat diinokulasikan ke dalam medium yang terdiri atas 10 % larutan susu skim yang mengandung 2 % agar. Biakan lalu dieramkan pada temperatur kamar ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ) dan  $37^{\circ}\text{C}$ . Dalam pengamatan selama 7 – 14 hari, isolat mampu menghidrolisis kasein yang terkandung dalam medium tersebut, yang dipelihatkan dengan adanya bagian yang cerah (bening) di sekitar koloni.
- 2) **Hidrolisis xantin dan tirosin :** Medium yang digunakan untuk uji ini mengandung ekstrak daging, pepton, agar, dan xantin dan tirosin. Biakan kemudian dieramkan pada temperatur kamar ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ) selama 4 minggu. Ternyata isolat mampu menghidrolisis xantin dan tirosin dengan menghilangnya butir-butir kristal kedua zat di sekitar koloni.
- 3) **Hidrolisis eskulin :** Medium ini mengandung kaldu infusi hati dan eskulin. Isolat yang dibiakkan dalam medium ini dan dieramkan selama 7 hari mampu menghidrolisis eskulin dengan adanya perubahan warna medium menjadi hitam kecoklatan setelah dibubuhi 1 % ferik sitrat.
- 4) **Hidrolisis pati :** Isolat diinokulasikan ke dalam medium yang terdiri atas larutan pati 1 %, neopepton 1 %, glukose 0,5 %, NaCl 0,1 % dan agar 2 %. Biakan dieramkan pada temperatur  $28^{\circ}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$ . Setelah diamati selama 3 — 4 hari, isolat mampu menghid-

rolisis pati itu dengan adanya warna biru di sekitar koloni, setelah ditambah iodium.

- 5) **Hidrolisis gelatin :** Isolat diinokulasikan ke dalam medium yang terdiri atas larutan pepton 0,5 % dan ekstrak daging (beef extract) 0,3%. Medium mengandung agar 1,5 % dan gelatin 0,4 %. Biakan dieramkan pada temperatur  $28^{\circ}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$ . Setelah diamati selama 5 hari, ternyata isolat menghidrolisis gelatin yang terkandung dalam medium dengan adanya warna bening di sekitar koloni, setelah penambahan larutan  $\text{HgCl}_2$  15 % dan HCl 20 %.
  - 6) **Hidrolisis urea :** Isolat diinokulasikan ke dalam medium agar urea (mengandung urea 2 %) dan dieramkan pada temperatur  $37^{\circ}$  dan  $27^{\circ}\text{C}$ . Setelah diamati kurang lebih 1 minggu, isolat menghidrolisis medium mengandung urea ini, dengan terjadinya perubahan warna menjadi merah cerah.
- b) **Pertumbuhan dalam 0,4 % gelatin :**  
Isolat diinokulasikan ke dalam medium mengandung gelatin 0,4 % dan dieramkan pada temperatur  $28^{\circ}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$  selama 5 sampai 25 hari. Uji ini ditujukan untuk melihat bentuk koloni yang tumbuh, perubahan sifat keasaman medium, pembentukan asam amino dan pencairan gelatin. Hasil pengamatan menunjukkan, bahwa koloni yang tumbuh berbentuk jonjot yang berada di dasar tabung, keasaman medium tidak berubah setelah ditetesi biru bromtimol (bromthymol blue) 0,04%, asam amino terbentuk di dalam medium, yang diperlihatkan dengan adanya cincin berwarna ungu di permukaan medium dengan uji ninhidrin, dan isolat juga mampu mencairkan gelatin, yang meskipun telah dimasukkan ke dalam lemari es (temperatur  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) selama 1-2 jam, medium tetap cair.
- c) **Pemakaian parafin :**  
Isolat diinokulasikan ke dalam medium agar ekstrak daging terlebih dahulu, lalu dieramkan pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$ . Koloni yang tumbuh kemudian diinokulasikan ke dalam medium larutan Czapek tanpa karbohidrat yang berada dalam tabung reaksi yang di dalamnya terdapat sebatang gelas berlapis parafin, lalu dieramkan lagi pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$ . Selama pengamatan 4 minggu, ternyata isolat tidak tumbuh di atas parafin itu.
- d) **Uji reduksi nitrat :**  
Isolat diinokulasikan ke dalam medium yang terdiri atas larutan pepton 0,5%, ekstrak daging

0,3 % dan  $\text{KNO}_3$  0,1 %, lalu dieramkan pada temperatur  $28^\circ\text{C}$ . Setelah diamati 5, 10 dan 14 hari, kemudian diadakan uji reduksi nitrat, ternyata isolat mampu mereduksi nitrat, karena tidak terjadi perubahan warna.

e) **Hemolisis agar darah :**

Isolat diinokulasikan ke dalam agar darah, lalu dieramkan pada temperatur kamar dan  $37^\circ\text{C}$ . Setelah 3 – 4 hari, ternyata isolat dapat menghemolisis medium agar darah.

f) **Pembentukan asam pada gula :**

Isolat diinokulasikan ke dalam medium yang terdiri atas  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 %, KCl 0,02 % dan  $\text{MgSO}_4$  0,02 %. Medium ini mengandung agar 1,5 % dan gula 10 %. Biakan dieramkan pada temperatur  $28^\circ\text{C}$ . Setelah 7 – 28 hari, ternyata isolat dapat membentuk asam pada medium yang mengandung gula maltose, mannose dan xilose, sedangkan pada medium yang mengandung gula laktose, asam tidak terbentuk

dan secara mikroskopik miseliumnya tidak berfragmentasi, sebagaimana telah dipelajari oleh Gordon & Smith (1955) dan Sochneidau & Shaffer (1957). Di samping itu, *Streptomyces* juga secara mikroskopik dapat dibedakan dari *Nocardia* dengan adanya konidiofora, meskipun pada beberapa spesies tidak mudah membentuk konidia, dan sebagai gantinya, reproduksi dilakukan dengan fragmentasi atau segmentasi bagian ujung miseliumnya (Al – Doory, 1980).

Suatu hal yang dapat dipakai sebagai pegangan dasar dalam mengidentifikasi genus *Streptomyces* sehingga dapat dibedakan dari aktinomiset aerob lainnya, khususnya dalam hal ini *Nocardia* ialah, bahwa *Streptomyces* selalu mempunyai miselium yang membentuk rantai spora yang terdiri atas tiga spora atau lebih, rantai itu berbentuk lurus, membengkok atau spiral, sedangkan sporanya sendiri mempunyai permukaan yang berbeda-beda, ada yang berpermukaan

PEMBAHASAN

Ikhtisar hasil pemeriksaan isolat, baik kultural maupun biokimiawi, dapat dilihat pada Tabel 1. Gambaran hasil pemeriksaan yang demikian ini sesuai benar dengan sifat-sifat dari kelompok aktinomiset aerob seperti telah dilukiskan oleh Kumar & Mohapatra (1968), Buchanan & Gibbons (1975), Al-Doory (1980) dan Jawetz dkk. (1980). Yang mereka maksudkan dengan aktinomiset aerob adalah genus *Actinomadura*, *Dermatophilus*, *Micromonospora*, *Nocardia* dan *Streptomyces* (Al – Doory, 1980). Dari pengamatan perbandingan terhadap sifat-sifat kultural dan biokimiawi kelima genus aktinomiset aerob tersebut di atas (Slack & Gerencser, 1975 dan Al – Doory, 1980), ternyata sifat-sifat isolat yang diteliti lebih mendekati sifat-sifat *Nocardia* dan *Streptomyces*.

Menurut Kumar & Mohapatra (1968) dan Buchanan & Gibbons (1975), organisme yang tidak membentuk rantai spora, melainkan fragmentasi miselium, pada umumnya tergolong genus *Nocardia*. Schneidau & Shaffer (1957) menyebutkan bahwa sebagian besar *Nocardia* mampu menggunakan parafin, dan justru dalam penelitian ini parafin tak mampu digunakan oleh isolat.

Slack & Gerencser (1975) dan Al – Doory (1980) mengatakan bahwa sebagian besar aktinomiset yang tak tumbuh pada parafin adalah genus *Streptomyces*. Tetapi sementara itu, *Streptomyces* sendiri tidak tahan asam, tidak menghidrolisis urea, tidak mencairkan gelatin, bereaksi positif membentuk asam pada laktose

Tabel 1. Hasil pemeriksaan Kultural dan biokimiawi isolat yang diduga aktinomiset (*Nocardia* sp).

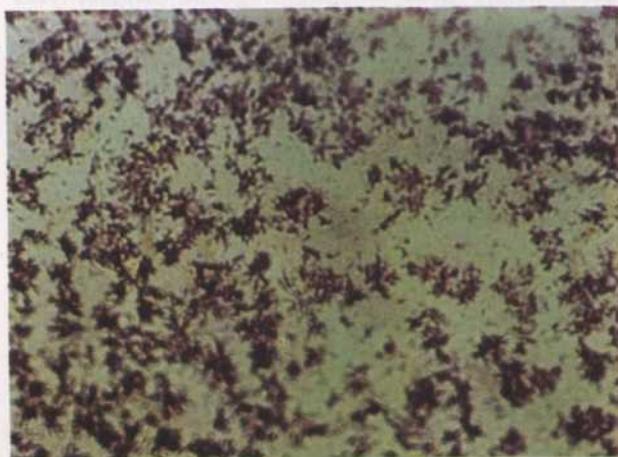
Spesifikasi pemeriksaan	Uraian hasil
<b>I. Kultural :</b>	
1. Makroskopik :	
– pertumbuhan koloni	– lambat, bersifat aerob
– permukaan	– keriput (bersifat), tak menonjol
– pinggiran koloni	– tak rata
– warna koloni	– krim kekuningan
– warna medium	– berubah-ubah sesuai umur : merah muda, coklat tua, lalu kuning keruh
2. Mikroskopik :	
– organisme	– miselium halus bercabang-cabang, berfragmentasi (kokoid dan basiler)
– pewarnaan tahan asam	– tahan asam sebagian
– pewarnaan Gram	+
<b>II. Uji Biokimiawi :</b>	
1. Uji hidrolisis :	
– kasein	+
– xantin dan tirosin	+
– eskulin	+
– p a t i	+
– gelatin	+
– u r e a	+
2. Pertumbuhan dalam 0,4 % gelatin	
	+
3. Pemakaian parafin	
	–
4. Uji reduksi nitrat	
	+
5. Hemolisis agar darah	
	+
6. Pembentukan asam pada gula	
	Mal(+), Man(+), Xil(+), Lak(-)

**Keterangan :**

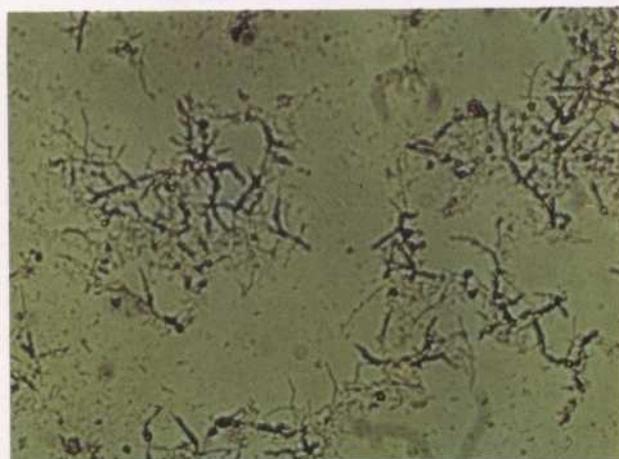
Mal = maltose, Man = mannose, Xil = xilose, Lak = laktose.

licin, ada pula yang permukaannya mempunyai tonjolan-tonjolan, atau berduri atau berambut, sedangkan sifat-sifat hidrolisis lainnya sama dengan *Nocardia* (Buchanan & Gibbons, 1975).

Atas dasar hal-hal yang disebutkan diatas, dikuatkan oleh kenyataan bahwa isolat yang diteliti mempunyai miselium halus, bercabang-cabang dan berfragmentasi kokoid dan basiler (Gambar 1 dan 2), maka isolat cenderung digolongkan ke dalam genus *Nocardia*.



Gambar 1. Gambaran mikroskopik contoh air susu mastitis dalam pewarnaan Gram (Gram positif).



Gambar 2. Gambaran mikroskopik aktinomiset hasil pembiakan dalam agar glukose Sabouraud dengan pewarna Gram (Gram positif).

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ini khususnya ditujukan kepada Mr. Colin King, teknisi dari Inggris yang dipekerjakan di Laboratorium Referens BAKITWAN, yang telah membantu mengidentifikasi isolat ini sehingga memungkinkan dapat disusunnya naskah ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- AJELLO, LIBERO, LUCILLE K. GEORG, WILLIAM KAPLAN & LEO KAUFMAN. 1963. Laboratory Manual for Medical Mycology. Public Health Service Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- AL-DOORY, YOUSEF. 1980. Laboratory Medical Mycology, Lea & Febiger, Philadelphia.
- AWAD, F.I. 1960. Nocardiosis of the bovine udder and testis. *Vet. Rec.* 72: 341-342.
- BLAKE, W.P. 1954. A report of two canine cases of nocardiosis in Missouri. *J. Am. vet. med. Ass.* 125: 467-468.
- BOJALIL, L.F. & J. CERBON. 1959. Schema for the differentiation of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *J. Bact.* 78: 852-857.
- BRUHL, H.G. 1963. Bovine mastitis caused by *Nocardia asteroides*. *Aust. vet. J.* 39: 305-307.
- BUCHANA, R.E. & N.E. GIBBONS. 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. The William & Wilkins Co., Baitomre.
- CROSS, R.F., W.T. NAGAO & R.H. MORRISON. 1953. Canine nocardiosis - A report of two cases. *J. Am. vet. med. Ass.* 123: 535-536.
- DEEM, DEBRA A. & DANIEL D. HARRINGTON. 1980 *Nocardia brasiliensis* in a horse with pneumonia and pleuritis. *Cornel Vet.* 70: 321-328.
- EALLES, JEAN D., D.D. LEAVER & JEAN SWAN. 1964. Bovine mastitis caused by *Nocardia*. *Aust. vet. J.* 40: 321-324.
- EVANS, A.C. 1918. A *Streptothrix* (*Nocardia*) infection of cows udder. *J. inf. Dis.* 23: 373.
- GEORG, LUCILLE K., LEBIRO AJELO, CAROLYN MCDURMONT & THOMAS S. HOSTY. 1961. The identification of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *Am. rev. resp. Dis.* 84: 337-347.
- GORDON, RUTH E. & JOAN M. MIHM. 1957. A comparative study of some strains received as nocardia. *J. Bact.* 73: 12-27.
- GORDON, RUTH E. & MILDRED M. SMITH. 1955. Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. *J. Bact.* 69: 47-150.
- HASTIONO, SUKARDI, DJAENUDIN GHOLIB, PADERI ZAHRI, SUDARISMAN & LYLI NATALIA. 1983. Mastitis mikotik pada sapi perah. Penelitian pendahuluan. Proceedings Pertemuan Ilmiah Ruminansia Besar, Cisarua, 6-9 Desember 1982. Puslitbang Peternakan Bogor: 193-201.
- IYER, P.K.R. & P.P. RAO. 1971. Suspected pulmonary nocardiosis in a duck. *Sabouraudia* 9: 79-80.
- JAWETZ, ERNEST, JOSEPH L. MELNICK & EDWARD A. ADELBERG. 1980. Review of Medical Microbiology. 14th Ed. Lange Medical Publication, Los Altos, California.
- JOHNSTON, L.A.Y. & M.D. CONNOLE. 1962. A case of bovine nocardial mastitis. *Aust. vet. J.* 38: 462-467.
- KINCH, D.A. 1968. A rapidly fatal infection caused by *Nocardia caviae* in a dog. *J. Path. Bact.* 95: 540-546.
- KUMAS, R. & L.N. MOHAPATRA. 1968. Studies on aerobic actinomycetes isolated from soil. II. Morphological and biochemical features of the isolates. *Sabouraudia* 6: 192-202.
- KWASPINKI, J.B.G. & G. HORSMAN. 1973. Cultural characterization and differentiation of nocardiae. *Can. J. Microbiol.* 19: 895-904.
- MUNGH-PETERSEN, E. 1954. *Actinomyces* (*Nocardia*) sp. from a bovine udder infection. *Aust. vet. J.* 30: 297-300.

- PARNELL, M.J., B.G. HUBBARD, K.C. FLETCHER & R.E. SCHMIDT. 1983. *Nocardia asteroides* infection in a purple throated sunbird (*Nectarinia sperapa*). *Vet. Pathol.* 20: 497-500.
- PIER, A.C., E.H. WILLERS & M.J. MEJIA. 1961. *Nocardia asteroides* as a mammary pathogen of cattle. II The sources of nocardial infection and experimental reproduction of the disease. *Am. J. vet. Res.* 22: 698-703.
- SCHEIDAU, JOHN D. & MORRIS F. SHAFFER. 1957. Studies on *Nocardia* and other *Actinomycetales*. I. Cultural Studies. *Am. rev. Tuber.* 76: 770-778.
- SLACT, JOHN M. & MARY ANN GERENCSEK. 1975. *Actinomyces, Filamentous Bacteria. Biology and Pathogenicity*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.
- THORDAL-CHRISTENSEN, AAGE & DONALD H. CLIFFORD. 1953. Actinomycosis (*Nocardiosis*) in a dog with a brief review of the disease. *Am. J. vet. Res.* 14: 298-306.
- TSUKAMURA, M. 1969. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. *J. gen. Microbiol* 56: 265-287.