

## Karakterisasi Faktor-faktor Virulensi *Staphylococcus aureus* Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa secara Fenotip dan Genotip

### Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolated from Peranakan Ettawa Goat Milk Phenotypic and Genotypically

Khusnan<sup>1</sup>, Wahyu Prihtiyantoro<sup>1</sup>, Hartatik<sup>1</sup>, Mitra Slipranata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akademi Peternakan Brahmputra, Jl. Ki Ageng Pemanahan, Nitikan, Sorosutan Umbulharjo Yogyakarta

<sup>2</sup>Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta.

Email: drh\_khusnan@yahoo.com

#### Abstract

*Staphylococcus aureus* is a major cause of mastitis in large or small ruminants, and often manifested by subclinical mastitis in Peranakan Ettawa (PE) goats. *Staphylococcus aureus* in human can cause food borne disease. The research aimed to characterize the virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from milk PE goats, phenotypic- and genotypically. Phenotypically characterization were determined through the pigmen assay as well as hydrophobicity, haemolysin, and hemagglutinin reaction. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to detect 4 virulen genes including *coa*, *clf*, *fnbA*, and *fnbB* genes. The results of research showed that *Staphylococcus aureus* abled to produce white pigmen (35,7%), yellow pigmen g (57,1%), and orange pigmen (7,2%). *Staphylococcus aureus* showed  $\alpha$ -hemolysis zone (35,7%),  $\beta$ -hemolysis (35,7%), dan  $\gamma$ -hemolysis (28,9%). Hydrophobicity test revealed 14,3% *Staphylococcus aureus* isolates were hydrophobe and 85,7% hydrophil. *Staphylococcus aureus* (85,7%) isolates abled to agglutinated sheep blood cells. Based on genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* could be detected *coa* gene (92,8%), *clf* gene (64,3%), *fnbA* gene (78,6%), and *fnbB* gene (64,3%). Based on the phenotypic and genotypic characters, it can be concluded that *Staphylococcus aureus* are virulent strains. This information can be used as the basis for control mastitis in PE goats.

**Key words :** *Staphylococcus aureus*, virulence factors, milk, PE goat

#### Abstrak

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri utama penyebab mastitis pada ruminansia besar maupun ruminansia kecil, dan sering ditemukan pada mastitis subklinis pada kambing Peranakan Ettawa (PE). Pada manusia *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan kasus keracunan pangan. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi terhadap berbagai faktor virulensi *Staphylococcus aureus* asal susu kambing PE secara fenotipik dan genotipik. Karakterisasi secara fenotipik dilakukan melalui uji pigmen, hidrofobisitas, hemolisin dan hemagglutinin. Metode *polymerase chain reaction* (PCR) dilakukan untuk karakterisasi genotipik dengan deteksi 4 gen virulen (*coa*, *clf*, *fnbA* dan *fnbB*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* mampu memproduksi pigmen putih (35,7%), pigmen kuning (57,1%), dan pigmen oranye (7,2%). *Staphylococcus aureus* memperlihatkan zona  $\alpha$ -hemolisis (35,7%),  $\beta$ -hemolisis (35,7%), dan  $\gamma$ -hemolisis (28,9%). Pada uji hidrofobisitas, sebanyak 14,3% isolat *Staphylococcus aureus* bersifat hidrofob dan 85,7% hidrofil. Pada uji hemagglutinasi menggunakan sel darah merah domba, sebanyak 85,7% isolat memiliki hemagglutinin. Hasil analisis genotipik *Staphylococcus aureus* dapat dideteksi gen *coa* (92,8%), gen *clf* (64,3%), gen *fnbA* (78,6%), dan gen *fnbB* (64,3%). Berdasarkan karakter fenotip dan genotip yang ditemukan dapat disimpulkan bahwa *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini bersifat virulen, data ini dapat digunakan sebagai dasar pengendalian kasus mastitis pada kambing PE.

**Kata kunci :** *Staphylococcus aureus*, factor virulensi, susu, kambing PE

## Pendahuluan

*Staphylococcus aureus* adalah salah satu penyebab utama mastitis pada sapi, kambing maupun domba (Mork *et al.*, 2005) dan sebagai agen penyebab utama mastitis subklinis pada kambing (Bourabah *et al.*, 2013). *Staphylococcus aureus* ditemukan dalam susu kambing mastitis klinis maupun mastitis subklinis (Widianingrum *et al.*, 2016). Mastitis akan menyebabkan kerusakan kelenjar penghasil susu, sehingga berpengaruh kepada kualitas dan kuantitas produksi susu (Portolano *et al.*, 2007).

*Staphylococcus aureus* memiliki beberapa faktor virulensi yang berkaitan dengan struktur sel maupun produk yang dikeluarkan oleh bakteri (Plata *et al.*, 2009). Faktor virulensi pada *S. aureus* antara lain tipe antigen permukaan, enzim degradasi, enterotoksin, leukosidin dan hemolisin (Peacock *et al.*, 2002), serta koagulase (Sutra dan Poutrel, 1994). Karakter pigmen pada *S. aureus* merupakan faktor virulensi telah dideteksi oleh Liu *et al.* (2005).

Antigen permukaan berperan dalam proses kolonisasi bakteri pada permukaan sel jaringan inang (Todar, 2005) dan memegang peranan penting dalam proses penempelan antara *S. aureus* dengan sel epitel (Ote *et al.*, 2011). Antigen permukaan terdiri dari *clumping factor* dan kapsul polisakarida (Ote *et al.*, 2011), serta hemaglutinin (Chanter *et al.*, 1993). Menurut Sabat *et al.* (2006) komponen permukaan mikroba yang berperan pada adesi diantaranya protein A, protein fibronektin (fnbA dan fnbB) serta *clumping factor*.

Keberadaan gen fnbA dan fnbB pada *S. aureus* isolat asal susu sapi telah dilaporkan oleh Haveri *et al.* (2008). Kalorey *et al.* (2007) melaporkan keberadaan gen *coa* dan gen *clf* pada *S.*

*aureus* isolat asal susu sapi mastitis subklinis. Pada *S. aureus* isola asal susu kambing keberadaan gen *coa* dilaporkan oleh da Silva *et al.* (2006).

Susu mentah merupakan media pertumbuhan yang ideal untuk beberapa mikroorganisme baik yang patogen maupun nonpatogen. Susu dan produk olahannya dapat berperan sebagai penyebar *S. aureus* pada manusia (Zecconi dan Hahn, 2000). Susu yang berasal dari ambing mastitis klinis biasanya dibuang dan tidak dicampurkan pada susu sehat, sehingga tidak menyebar dan menjadi sumber bakteri patogen, tetapi susu yang berasal dari ambing mastitis subklinis akan dicampurkan pada susu sehat, sehingga ikut masuk dalam rantai produksi selanjutnya. *S. aureus* sebagai penyebab utama mastitis subklinis akan menyebar dan menginfeksi konsumen melalui konsumsi susu dan produk susu terkontaminasi yang dihasilkan dari ambing mastitis subklinis (Bharathy *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini telah dilakukan karakterisasi faktor virulensi secara fenotip dan genotip yang berkaitan dengan antigen permukaan pada *S. aureus* isolat asal susu kambing PE mastitis subklinis.

## Materi dan Metode

Penelitian ini digunakan 14 isolat *S. aureus* asal dari susu kambing PE yang telah diidentifikasi oleh Khusnan *et al.* (2015). Keempatbelas isolat dilakukan karakterisasi faktor virulensi secara fenotip dan genotip. Secara fenotip dilakukan karakterisasi jenis hemolisis, keberadaan hemaglutinin, deteksi kapsul permukaan dan produksi pigmen, sedangkan secara genotip dilakukan deteksi gen 16SrRNA, *nuc*, *coa*, *clf*, *fnbA*

dan fnbB.

Karakterisasi jenis hemolisis dilakukan seperti yang dikerjakan de los Santos *et al.* (2014). *Staphylococcus aureus* ditanam pada media plat agar darah domba. Plat diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, dan kemudian disimpan pada suhu 4°C. Pengamatan dilakukan terhadap karakter zona hemolisis disekeliling koloni bakteri. Karakter - hemolisis apabila terbentuk zona agak gelap kehijauan, karakter -hemolisis apabila terbentuk zona terang, karakter /-hemolisis apabila terbentuk kombinasi zona terang dan agak gelap kehijauan serta karakter -hemolisis apabila tidak terlihat adanya zona hemolisis disekitar koloni.

Uji hemaglutinasi dilakukan seperti metode Wibawan *et. al.* (1993), uji hemaglutinas, digunakan darah kelinci dengan antikoagulan 0,2 M sodium sitrat pH 5,2. Preparasi eritrosit dilakukan dengan cara darah kelinci disentrifus, 2000 rpm 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 l larutan bakteri yang telah ditentukan optical density (OD) nya dengan spektrofotometer transmisi dan 620 nm (kira-kira 10<sup>9</sup> bakteri/ml 0,15 NaCl) dengan 20 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 dibawah sumuran mikroplat.

Produksi jenis pigmen yang diproduksi *S. aureus* dapat diamati dengan cara mengulaskan isolat *S. aureus* di atas membran nitroselulose yang diletakkan di atas plat agar darah domba, warna pigmen akan terlihat setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Brückler *et al.*, 1994).

Deteksi kapsul permukaan *S. aureus* dikerjakan seperti yang dilakukan Franco *et al.* (2008), menggunakan media Serum Soft Agar (SSA). Suspensi *S. aureus* ditanamkan dalam 10 ml media BHI yang sudah ditambahkan 1% serum kelinci pada suhu 45°C dan divortex selama 10 detik, kemudian diinkubasi pada 37° C selama 18 jam. Morfologi kolonial dievaluasi. Koloni yang tumbuh difus dianggap memiliki kapsul, dan pertumbuhan koloni kompak dianggap tidak berkapsul.

### **Preparasi DNA**

Deoxyribonucleotide acid (DNA) pada isolat *S. aureus* diekstraksi menggunakan Qiamp tissue kit (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Bakteri ditanam pada plat agar darah selama 24 jam, pada suhu 37°C, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam bufer 180 µl TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8, kemudian ditambahkan 5 µl lysostaphin (1.8 U/ µl; Sigma, Jerman), suspensi diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 µl proteinase K (14,8 mg/ml; Sigma, Jerman) dan 200 µl buffer AL (yang berisi reagen AL 1 dan AL 2). Suspensi bakteri kemudian diinkubasi selama dua jam pada suhu 56°C, di-vortex supaya homogen, segera dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit kemudian didinginkan pada suhu 4°C selama 10 menit. Suspensi kemudian disentrifus selama 15 detik, sebanyak 420 µl etanol ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan ke dalam kolom QIAamp. Kolom QIAamp kemudian disentrifugasi selama satu menit, segera ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 µl AW (Qiagen, Jerman). Kolom QIAamp disentrifus selama tiga menit, kemudian ditempatkan di atas tabung dengan dua ml dan DNA

yang ada pada kolom dielusi dengan 200 µl bufer suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2004).  
AE. Hasil eluat sampel DNA dapat disimpan pada

Table 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR.

| Gen      | Sekuen primer  | Program* | Referensi                    |
|----------|--|----------|------------------------------|
| 16 SrRNA | 5'AGC GAG TTA CAA AGG AGG AC 3'<br>3'AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC 5'       | 1        | Straub <i>et al.</i> , 1999  |
| nuc      | 5'GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3'<br>3'ACG CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC 5' | 2        | Salasia <i>et al.</i> , 2011 |
| coa      | 5'ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3'<br>3' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C 5'        | 3        | Salasia <i>et al.</i> , 2011 |
| clf      | 5'GGC TTC AGT GCT TGT AGG<br>3'TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC 5'             | 4        | Salasia <i>et al.</i> , 2011 |
| fnbA     | 5' GCG GAG ATC AAA GAC AA 3'<br>3' CCA TCT ATA GCT GTG TGG 5'            | 5        | Salasia <i>et al.</i> , 2004 |
| fnbB     | 5' GGA GAA GGA ATT AAG GCG 3'<br>3' GCC GTC GCC TTG AGC GT 5'            | 5        | Salasia <i>et al.</i> , 2004 |

Keterangan : \*

- 1 : 30 kali 94°C-120 detik, 64°C-40 detik, 72°C-75 detik
- 2 : 30 kali 94°C-60 detik, 58°C-60 detik, 72°C-60 detik
- 3 : 35 kali 94°C-60 detik, 57°C-60 detik, 72°C-60 detik
- 4 : 37 kali 94°C-60 detik, 55°C-30 detik, 72°C-30 detik
- 5 : 30 kali 94°C-60 detik, 53.7°C-45 detik, 72°C-75 detik
- 6 : 33 kali 94°C-60 detik, 59°C-45 detik, 72°C-60 detik
- 7 : 33 kali 94°C-60 detik, 53°C-45 detik, 72°C-30 detik

## Hasil dan Pembahasan

Empat belas isolat secara fenotip telah diidentifikasi sebagai *S. aureus* oleh Khusnan *et al.* (2015). Pada penelitian ini semua isolat *S. aureus* tersebut diidentifikasi ulang secara genotip dengan menggunakan teknik PCR, meliputi deteksi gen 16S rRNA, gen nuc dan gen coa. Hasilnya masing-masing sebesar 100%, 100% dan 64% (Tabel 2). Identifikasi *S. aureus* dengan cara deteksi gen-gen spesifik telah digunakan Aziz *et al.* (2014). Identifikasi *S. aureus* menggunakan teknik PCR memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan metode konvensional serta memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Tamarapu *et al.*, 2001).

Identifikasi *S. aureus* asal susu sapi mastitis berdasarkan gen 16S rRNA, gen nuc dengan teknik PCR telah digunakan Proietti *et al.* (2010) dan dilaporkan semua isolat *S. aureus* memiliki gen 16S

Deteksi gen 16SrRNA, nuc, coa, clf, fnbA, gen fnbB pada *S. aureus* ditentukan dengan menggunakan primer spesifik dengan program *polymerase chain reaction* (PCR) yang telah ditentukan berdasarkan referensi (Salasia *et al.*, 2004). Campuran untuk PCR sebanyak 25 µl terdiri atas 2 µl primer forward 10 pmol, 2 µl primer reverse 10 pmol, 14 µl PCR mix, 2 µl DNA dan 5 µl aquades steril. Campuran kemudian disentrifuse beberapa detik, dan dimasukkan dalam *thermal cycler* dengan program sesuai Salasia *et al.* (2004). Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis dengan 2% agarose dan Syber safe kemudian divisualisasi dengan UV transluminator, dibandingkan dengan kontrol dan marker 1 kb DNA Ladder (1 µg/µl; Invitrogen).

rRNA dan gen nuc. Menurut Bettin *et al.* (2010) keberadaan gen nuc sebagai penanda isolat *S. aureus*. Identifikasi *S. aureus* berdasarkan deteksi gen nuc telah digunakan oleh banyak peneliti (Kilic *et al.*, 2010). Deteksi gen nuc dengan teknik PCR merupakan metode cepat dan akurat untuk identifikasi *S. aureus* (Sahebnaasagh *et al.*, 2014)

Teknik ini telah digunakan untuk deteksi *S. aureus* yang berasal dari spesimen penyakit klinis maupun subklinis (Maes *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 2002), dan juga digunakan untuk identifikasi *S. aureus* pada susu unta subklinis (Njage *et al.*, 2013), susu kambing subklinis (Shivairo *et al.* (2013) dan susu kambing mastitis (da Silva *et al.*, 2006). Pada penelitian ini semua isolat yang terdeteksi gen 16S rRNA juga memiliki gen nuc.

Pada penelitian ini distribusi gen coa, gen *clf*, gen *hlyA* dan *hlyB* masing-masing sebesar 92,8%; 64,3%; 78,6% dan 64,3%. Isolat-isolat yang diteliti memiliki sedikitnya dua gen yang

berhubungan virulensi yang dideteksi, yaitu 3 isolat memiliki 2 gen, 8 isolat memiliki 3 gen, serta 3 isolat memiliki keempat gen virulensi yang dideteksi.

Deteksi gen coa menggunakan teknik PCR telah digunakan untuk identifikasi *S. aureus* dari spesimen susu sapi mastitis (Khan *et al.*, 2013), serta spesimen susu kambing (da Silva *et al.*, 2006). Teknik ini merupakan metode sederhana, cepat dan efisien (Gharib *et al.*, 2013).

Gen coa berperan sebagai faktor virulensi pada *S. aureus*, yaitu berfungsi sebagai pertahanan terhadap fagositosis netrofil dan berperan pada proses infeksi. Pada penelitian ini distribusi gen coa sebesar 64,28%. Menurut Sanjiv *et al.* (2008) tidak semua isolat *S. aureus* memiliki gen coa. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Dehkordi *et al.* (2015), bahwa *S. aureus* isolat susu sapi mastitis subklinis sebesar 37,5%. Karahan dan Cetinkaya (2007) melaporkan 80,5% isolat asal susu sapi mastitis subklinis memiliki gen coa.

Tabel 2. Karakter virulensi *S. aureus* secara fenotip dan genotip

| No | Kode spesimen | Fenotip |           |               |                | Genotip  |            |            |            |             |             |
|----|---------------|---------|-----------|---------------|----------------|----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
|    |               | Pigmen  | Hemolisis | Hidro fobitas | Hem aglutinasi | 16S rRNA | <i>nuc</i> | <i>coa</i> | <i>clf</i> | <i>fnbA</i> | <i>fnbB</i> |
| 1  | 1.5           | putih   | $\beta$   | -             | +              | +        | +          | +          | -          | +           | +           |
| 2  | 1.7           | putih   | $\gamma$  | -             | +              | +        | +          | +          | -          | +           | +           |
| 3  | 1.14          | kuning  | $\gamma$  | -             | +              | +        | +          | +          | +          | +           | -           |
| 4  | 1.15          | kuning  | $\beta$   | -             | +              | +        | +          | +          | +          | +           | -           |
| 5  | 1.20          | kuning  | $\alpha$  | +             | +              | +        | +          | -          | +          | -           | +           |
| 6  | 1.34          | orange  | $\gamma$  | +             | +              | +        | +          | +          | +          | +           | -           |
| 7  | 1.38          | kuning  | $\alpha$  | -             | +              | +        | +          | +          | -          | +           | -           |
| 8  | 1.44          | kuning  | $\alpha$  | -             | -              | +        | +          | +          | +          | -           | +           |
| 9  | 1.45          | kuning  | $\beta$   | -             | +              | +        | +          | +          | +          | +           | +           |
| 10 | 1.47          | putih   | $\beta$   | -             | -              | +        | +          | +          | +          | +           | +           |
| 11 | 2.1           | putih   | $\gamma$  | -             | +              | +        | +          | +          | +          | -           | -           |
| 12 | 4.4           | putih   | $\beta$   | -             | +              | +        | +          | +          | -          | +           | +           |
| 13 | 4.12          | kuning  | $\gamma$  | -             | +              | +        | +          | +          | -          | +           | +           |
| 14 | 4.8           | kuning  | $\alpha$  | -             | +              | +        | +          | +          | +          | +           | +           |



*Staphylococcus aureus* isolat asal susu sapi mastitis klinis 80,60% memiliki gen *coa* (Momtaz *et al.*, 2010). Elsayed *et al.* (2015) melaporkan *S. aureus* asal susu sapi dan kerbau baik yang dari mastitis klinis maupun mastitis subklinis 100% terdeteksi gen *coa*. Laporan Scherrer *et al.* (2004) *S. aureus* isolat susu sapi, kambing dan domba 100% terdeteksi gen *coa*. Produk susu olahan 45,9% isolat *S. aureus* memiliki gen *coa* (Dehkordi *et al.*, 2015).

*Clumping factor* (*clf*) merupakan salah satu faktor adhesin yang penting dan telah diidentifikasi sebagai faktor virulensi pada *S. aureus* (Perkins *et al.*, 2001). Gen *clf* merupakan faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. aureus* yang berperan sebagai faktor penggumpal (Vancraeynest *et al.*, 2006). Faktor penggumpal merupakan protein adhesi yang penting pada *S. aureus* yang diatur oleh gen *clf* (Stephan *et al.*, 2001).

Gen *clf* berperan pada permukaan bakteri yang mengendalikan proses adhesi (Mc Devitt *et al.*, 1994), dan berperan dalam proses kolonisasi dan proses awal infeksi (Karahana *et al.*, 2011), serta menghambat proses fagositosis oleh makrofag (Higgins *et al.*, 2006). Pada penelitian ini 64,3% *S. aureus* terdeteksi memiliki gen *clf*. Gen *clf* dilaporkan terdeteksi pada sebagian besar isolat *S. aureus* (Salasia *et al.*, 2004). Elsayed *et al.* (2015) melaporkan *S. aureus* asal susu sapi dan kerbau baik yang dari mastitis klinis maupun mastitis subklinis 100% terdeteksi gen *clf*. De Almeida *et al.* (2013) melaporkan distribusi gen *clf* pada *S. aureus* asal susu domba sebesar 100%

Singh *et al.* (2011) melaporkan gen *clf* pada isolat *S. aureus* asal susu kerbau Murrah sebesar 94,9%, Isolat *S. aureus* yang berasal dari kasus sapi mastitis klinis sebesar 97% (Yang *et al.*, 2012), sedangkan yang berasal dari mastitis subklinis

sebesar 63% (Momtaz *et al.*, 2010) sebesar 59% (Memon *et al.*, 2013), sebesar 91% (Karahana *et al.*, 2011). *Staphylococcus aureus* isolat asal susu domba 100% memiliki gen *clf* (de Almeida *et al.*, 2013). *S. aureus* isolat dari manusia sebesar 90,4% (Paniagua-Contreras *et al.*, 2014) dan *S. aureus* isolat asal kelinci sebesar 90% (Ashraf *et al.*, 2014).

Faktor penggumpalan (*clf*) bersama dengan gen fibronektin mengikat protein A/B (*fnbA* dan *fnbB*) merupakan faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. aureus* (Vancraeynest *et al.*, 2006). *FnbA* dan *fnbB* berperan pada proses adhesi (Campbell *et al.*, 2008) dan invasi ke dalam sel inang (Massey *et al.*, 2001). *FnbA* dan *fnbB* merupakan faktor virulensi yang terbukti mencegah fagositosis oleh leukosit (Higgins *et al.*, 2006).

Menurut Stutz *et al.* (2011) *fnbA* dan *fnbB* bersama-sama faktor virulensi lainnya berperan pada proses adhesi dan pertahanan terhadap respon imun inang. *FnbA* dan *fnbB* berperan pada kasus infeksi sistemik (Shinji *et al.*, 2011). Isolat *S. aureus* yang memiliki gen fibronektin lebih virulen dibandingkan yang tidak memiliki gen fibronektin.

Pada penelitian ini 78,6% isolat memiliki gen *fnbA* dan 64,3% memiliki gen *fnbB*. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Tang *et al.* (2013) bahwa 87,50% isolat *S. aureus* memiliki gen *fnbA* dan 68,75% memiliki gen *fnbB*. Distribusi gen *fnbA* dan *fnbB* bervariasi, isolat susu sapi mastitis klinis terdeteksi gen *fnbA* sebesar 97% dan tidak ditemukan gen *fnbB* (Yang *et al.*, 2012) sedangkan Ikawaty *et al.* (2010) gen *fnbA* sebesar 96% dan gen *fnbB* 43%. Tang *et al.* (2013) melaporkan gen *fnbA* terdeteksi 87,50% dan 68,75% terdeteksi gen *fnbB*, sedangkan Ghasemian *et al.*, 2015) melaporkan gen *fnbA* terdeteksi 67% dan 56% terdeteksi gen *fnbB*. Perbedaan hasil penelitian

yang dilaporkan menunjukkan bahwa distribusi *fnbA* dan *fnbB* bervariasi (Proietti *et al.*, 2010).

Pigmen merupakan faktor virulensi *S. aureus* yang dapat dideteksi menggunakan membran nitrocellulose (Liu *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi 3 jenis pigmen, yaitu pigmen orange, kuning dan putih (Salasia *et al.*, 2010). Pigmen kuning dan orange yang diproduksi *S. aureus* dikaitkan dengan tingkat virulensi (Liu *et al.*, 2008). Kuman yang memproduksi pigmen kuning ataupun orange biasanya lebih patogen dibanding kuman yang memproduksi pigmen putih (Han *et al.*, 2000), dan isolat yang memproduksi pigmen orange lebih virulen dibandingkan dengan yang memproduksi pigmen kuning (Khusnan *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini 7,2% isolat memproduksi pigmen orange, 57,1% memproduksi pigmen kuning dan 35,7% memproduksi pigmen putih. El-Jakee *et al.* (2008) melaporkan isolat asal susu sapi memproduksi pigmen orange 66%, kuning lembut 30,2% dan pigmen putih 3,8%. Salasia *et al.* (2011) melaporkan *S. aureus* yang berasal dari pangan olahan berbahan asal ternak susu sapi memproduksi tiga jenis pigmen yaitu orange, kuning dan putih dengan persentase berturut-turut orange 50,0%, kuning 22,3% dan putih 27,7%.

Hemolisin berperan penting dalam patogenisitas *S. aureus* (Burnside *et al.*, 2010). Hemolisin bertanggung jawab dalam penghancuran hemoglobin dan berkontribusi untuk mengurangi jumlah eritrosit dalam darah (Le Mare'chal *et al.*, 2011). *S. aureus* telah diidentifikasi memproduksi empat hemolisin yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , dan  $\delta$  (Chu *et al.*, 2013). Menurut Park *et al.* (2004)  $\alpha$  dan  $\beta$  hemolisin yang paling penting dalam patogenesis infeksi, yaitu  $\alpha$ -hemolisin memiliki potensi hemolisis,

dermatotoksik dan menyebabkan neurotoksik (Dinges *et al.*, 2000) serta menyebabkan kematian sel target (Vandenesch *et al.*, 2012).  $\beta$ -hemolisin adalah sphingomyelinase yang berperan melisiskan eritrosit domba maupun sapi (Larsen *et al.*, 2002). Interaksi antara  $\alpha$ -hemolisis dan  $\beta$ -hemolisis meningkatkan kemampuan *S. aureus* pada proses infeksi pada sel epitel (Ali-Vehmas *et al.*, 2001).

Hasil penelitian menunjukkan 35,7% isolat memproduksi  $\alpha$ -hemolisis, 35,7% memproduksi  $\beta$ -hemolisis dan 28,9% memproduksi  $\gamma$ -hemolisis. *S. aureus* isolat asal susu sapi biasanya lebih banyak yang memproduksi  $\beta$ -hemolisis (Franco *et al.*, 2008). Pada penelitian ini *S. aureus* yang memproduksi  $\beta$ -hemolisis lebih banyak dibandingkan dengan yang memproduksi  $\alpha$ -hemolisis. Hasil yang sama telah dilaporkan Akineden *et al.*, (2001), *S. aureus* isolat asal susu sapi mastitis 66,62% memproduksi  $\beta$ -hemolisis dan 33,31% memproduksi  $\alpha$ -hemolisis. Elsayed *et al.* (2015) melaporkan *S. aureus* isolat asal sapi dan kerbau 43,75% memproduksi  $\beta$ -hemolisis dan 34,4% memproduksi  $\alpha$ -hemolisis. Jahan *et al.* (2015) melaporkan semua isolat *S. aureus* asal susu sapi hanya memproduksi  $\beta$ -hemolisis. Susu sapi mastitis klinis 88% *S. aureus* memproduksi  $\beta$ -hemolisis dan 12% strain tidak hemolitik (Puacz *et al.*, 2015).

Hasil penelitian pada media Serum Soft-Agar (SSA) menunjukkan 14,3% koloni berbentuk kompak dan 85,7% koloni tumbuh difus. Hasil penelitian ini mirip yang dilaporkan Han *et al.* (2000) bahwa 83,2% *S. aureus* isolat asal susu sapi mastitis pada media SSA koloninya tumbuh difus. Franco *et al.* (2008) melaporkan 69% *S. aureus* isolat sapi mastitis berkapsul dan 31% tidak berkapsul. Koloni berbentuk difus pada SSA diartikan struktur bakteri memiliki kapsul

permukaan dan morfologi koloni berbentuk kompak diartikan struktur bakteri tidak memiliki kapsul permukaan (Franco *et al.*, 2008).

Keberadaan kapsul permukaan sel bakteri merupakan faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. aureus* (Tuchscher *et al.*, 2007). Isolat yang berkapsul lebih virulen dan lebih tahan terhadap proses fagositosis dibandingkan dengan isolat yang tidak berkapsul (Lee *et al.*, 1987). *S. aureus* yang memiliki kapsul merupakan strain yang lebih tahan terhadap fagositosis dari pada strain yang tidak berkapsul dan bakteri mampu tetap hidup dalam tubuh inang yang terinfeksi (Thakker *et al.*, 1998).

Keberadaan hemaglutinin pada *S. aureus* dapat dideteksi dengan uji hemaglutinasi (Abrar *et al.*, 2012). Hemaglutinin merupakan salah satu penentu patogenisitas *S. aureus* (Rupp *et al.*, 1995). Hemaglutinin merupakan salah satu komponen adesin bakteri yang memperantarai perlekatan sel bakteri pada sel darah merah (Rupp *et al.*, 1995). Bakteri yang memiliki hemaglutinin memiliki kemampuan adesi yang sangat tinggi sedangkan pada bakteri yang tidak memiliki hemaglutinin tidak memiliki kemampuan adesi pada sel epitel (Abrar *et al.*, 2012).

Menurut Abrar *et al.* (2012) isolat *S. aureus* yang mampu menggumpalkan sel darah merah pasti memiliki hemaglutinin. Deteksi hemaglutinin menggunakan uji hemaglutinasi dengan menggunakan sel darah merah domba. 85,7% isolat memiliki hemaglutinin dan 14,3% isolat tidak memiliki hemaglutinin. Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan *S. aureus* isolat susu sapi mastitis, Rupp *et al.* (1995) melaporkan hanya 23% yang menggumpalkan eritrosit domba. de Los Santos *et al.* (2014) melaporkan hanya 35% isolat asal susu sapi mastitis subklinis menggumpalkan eritrosit domba.

Patogenesis oleh *S. aureus* merupakan multifaktorial dari banyaknya faktor virulensi yang dimiliki *S. aureus*, sehingga membuat sulit untuk menentukan peran yang tepat dari faktor virulensi tertentu yang berperan dalam patogenisitas tersebut. Pada penelitian ini 7% isolat memiliki 3 faktor virulen, 7% isolat memiliki 4 faktor virulen, 50% isolat memiliki 5 faktor virulen, 21% isolat memiliki 6 faktor virulen dan 14% isolat memiliki 7 faktor virulen. Menurut Franco *et al.* (2008) peran faktor virulensi ada hubungannya dengan patogenisitas yang terjadi dan *S. aureus* yang memiliki dua atau lebih faktor virulensi dapat meningkatkan patogenisitas.

### Kesimpulan

*Staphylococcus aureus* isolat asal susu kambing PE secara fenotip dan genotip disimpulkan sebagai strain virulen. Isolat-isolat tersebut paling sedikit memiliki 3 faktor virulen dan tertinggi memiliki 7 faktor virulen dari 8 faktor virulensi yang diteliti. Ditemukannya isolat *S. aureus* yang bersifat virulen dalam susu segar kambing PE dapat berkontribusi pada penularan antar kambing PE dan kasus keracunan pangan.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Kopertis Wilayah V Yogyakarta Kementerian RISTEKDIKTI. Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian, DIPA, 023.04.1.673453/2015 tanggal 14 November 2014 dan DIPA Revisi, 01 tanggal 29 Pebruari 2015. Peneliti mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini



### Daftar Pustaka

- Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M. and Pasaribu, F.H. (2012) Isolation and characterization haemagglutinin of *Staphylococcus aureus* on subclinical mastitis in dairy cows. *J. Kedokteran Hewan*. 6(1): 16-21.
- Akineden, O., Annemuler, C., Hassan, A.A., Laemmler, C., Wolter, W. and Zschock, M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. and Diagn. Labor. Immunol.* 8(5): 959–964.
- Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Pyorala, S. and Atroshi, F. (2001) Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiol. Res.* 155(4): 339-344.
- Ashraf, A. El-Tawab, A., Maarouf A.A.A., El-Hofy, I.F. and Khalil, A.O.S. (2014) Detection of some virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits by Polymerase Chain Reaction. *Benha Vet. Med. J.* 27(2): 58-69.
- Aziz, F., Salasia, S.I.O. and Slipranata, M. (2014) Genetic determination and clonal relationships of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows in Baturraden, Central Java, Indonesia. *Indon. J. of Biotechnol.* 19(2): 121-128.
- Bettin, A., Causil, C. and Reyes, N. (2010) Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *Braz. J. Infect. Dis.* 16(4): 329–334
- Bharathy, S., Gunaseelan, L., Porteen, K. and Bojiraj, M. (2015) Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk: can it be a potential public health threat?. *Int. J. of Adv. Res.* 3(2): 801-806.
- Bourabah, A., Ayad, A., Boukraa, L., Hammoudi, S.M. and Benbarek, H. (2013) Prevalence and etiology of subclinical mastitis in goats of the tiaret region, Algeria *Global Veterinaria* 11(5): 604-608.
- Brückler J., Schwarz S., Untermann F., 1994. *Staphylokokken-Infektionen und –Enterotoxine*, Band. II/1, In Blobel, H. und Schlieer (eds.), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Burnside, K., Lembo, A., de los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran, N., Connelly, J.E., Lin, W., Schmidt, B.Z., Richardson, A.R., Fang, F.C., Tao, W.A. and Rajagopal, L. (2010) Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS ONE*. 5(6): 1-16 [www.plosone.org](http://www.plosone.org).
- Campbell, S.J., Deshmukh, H.S., Nelson, C.L., Bae, I.G., Stryjewski, M.E., Federspiel, J.J., Tonthat, G.T., Rude, T.H., Barriere, S.L., Corey, R. and Fowler, V.G.Jr. (2008) Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J. Clin. Microbiol.* 46: 678–684.
- Chanter, N., Jones, P.W. and Alexander, T.J.L. (1993) Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*-a speculative review. *Vet. Microbiol.* 36: 39-55.
- Chu, C., Wei, Y., Chuang, S.T., Yu, C., Changchien, C.H. and Su, Y. (2013) Differences in virulence genes and genome patterns of mastitis-associated *Staphylococcus aureus* among goat, cow, and human isolates in Taiwan. *Foodborne Pathol. Dis.* 10(3): 256-262.
- da Silva, E.R., Boechat, J.U.D. and da Silva, N. (2006) Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. *Letters in Appl. Microbiol.* 42: 30-34.
- de Almeida, L.M., de Almeida, M.Z. de Mendonca, C.L. and Mamizuka, E.M. (2013) Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. *Braz. J. of Microbiol.* 44(2): 493-498.

- de Los Santos R., Fernandez M., Carro S. and Zunino P. (2014) Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastitis in two Uruguayan dairy farms. *Arch. Med. Vet.*, 46: 315-320.
- 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.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 16-34.
- El-Jakee, J., Nagwa, A.S., Bakry, M., Zouelfakar, S.A., Elgabry, E. and El-Said, W.A.G. (2008) Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and animal sources. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 4:221–229.
- Elsayed, M.S., El-Bagoury, A.E.M. and Dawoud, M.A. (2015) Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Vet. World.* 8(9): 1051-1058.
- Franco, G.J.C., Gonzalez, V.L., Gomez, M.S.C., Carrillo, G.J.M. and Ramirez, C.J.J. (2008) Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Mexico. *eGnosis (online)* 6(7): 1-10 [www.e-gnosis.udg.mx/vol6/art7](http://www.e-gnosis.udg.mx/vol6/art7).
- Gharib, A.A., Attia, M.A.A. and Bendary, M.M. (2013) Detection of the *coa* gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by Polymerase Chain Reaction. *Int. J. of Microbiol. Res.* 4(1): 37-42.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslöf, A. and Pyörälä, S. (2008) Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites. *J. Clin. Microbiol.* 46(11): 3728-3735.
- Higgins, J., Loughman, A., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A. and Foster, T.J. (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 258: 290-296.
- Jahan, M., Rahman, M., Parvej, S., Chowdhury, Z.H., Haque E., Talukder, A.K. and Ahmed, S. (2015) Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2(1): 49-55.
- Kalorey, D.R., Shanmugam, Y., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K. and Barbudde, S.B. (2007) PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *J Vet Sci.* 8(2): 151-154.
- 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.
- Karahan, M., Aciki, M. and Cetinkaya, B. (2011) Investigation of virulence genes by pcr in *Staphylococcus aureus* isolates originated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Pak. Vet. J.* 31: 249-253.
- Khan, A., Hussain R., Javed M.T. and Mahmood, F. (2013) Molecular analysis of virulent genes (*coa* and *spa*) of *Staphylococcus aureus* involved in natural cases of bovine mastitis. *Pak. J. Agri. Sci.* 50(4): 739-743.
- Khusnan, Prihtiyantoro, W. and Slipranata, M. (2014) *Staphylococcus aureus* producing yellow pigment isolated from bumblefoot case in broiler chickens is more pathogenic than those of producing white pigment. *J. Vet.* 15 (4): 467-473.
- Khusnan, Prihtiyantoro, W. dan Hartatik. (2015) Pengembangan deteksi cepat staphilokokal mastitis pada kambing Peranakan Ettawa dengan biomarker protein A. Laporan Penelitian 2015. DP2M Kementerian Ristekdikti.

- Kilic, A., Muldrew, K.L., T angc, Y.W. and Basustaoglua, A.C. (2010) Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 66: 349-355.
- Le Marechal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo V., Francois, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., Even, S., Berkova, N., Thiery, R., Fitzgerald, J.R., Vautor, E., Le Loir, Y. (2011) Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One.* 6: e27354.
- Lee, J.C., Betley, M.J., Hopkins, C.A., Perez, N.E. and Pier, G.B. (1987) Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *J. Infect. Dis.* 156: 741-750.
- Liu, C., Liu, G.Y., Song, Y., Yin, F., Hensler, M.E., Jeng, W., Nizet, V., Wang, A.H. and Oldfield E. (2008) Cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science.* 319:1391–1394.
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J. and Nizet, V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* 202: 209-215.
- Louie, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M. and Simor, A.E. (2002) Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2786–2790.
- Massey, R.C., Kantzanou, M.N., Fowler, T., Day, N.P., Schofield, K., Wann, E.R., Berendt, A.R., Hook, M., and Peacock, S.J. (2001) Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 3: 839–851.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. and Foster, T.J. (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 11: 237–248.
- Memon, J., Yang, Y., Kashifa, J., Yaqoob, M., Buriroa, R., Soomro, J., Liping, W. and Hongjie, F. (2013) Genotypes, virulence factors and antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine subclinical mastitis from Eastern China. *Pak. Vet. J.* 33(4): 486-491.
- Momtaz, H., Rahimi, E. and Tajbakhsh, E. (2010) Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. *Afr. J. of Biotechnol.* 9(25): 3753-3758.
- Mork, T., Tollersrud, T., Kvitle, B., Jørgensen, H.J. and Waage, S. (2005) Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3979–3984.
- Njage, P.M.K., Dolci, S., Jans, C., Wangoh, J., Lacroix, C. and Meile, L. (2013) Biodiversity and enterotoxigenic potential of *Staphylococci* isolated from raw and spontaneously fermented camel milk. *Br. Microbiol. Res. J.* 3: 128-138.
- Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.N., Dizier, I. and Mainil, J.G. (2011) Genotypic characterization by Polymerase Chain Reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153: 285–292.
- Paniagua-Contreras, G.L., Monroy-Perez, E., Vaca-Paniagua, F., Rodriguez-Moctezuma, J.R., Negrete-Abascal, E. and Vaca, S. (2014) Implementation of a novel in vitro model of infection of reconstituted human epithelium for expression of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheter-related infections in Mexico. *Annals of Clin. Microbiol. and Antimicrobials.* 13: 6-13.
- Park, P.W., Foster, T.J., Nishi, E., Duncan, S.J., Klagsbrun, M. and Chen, Y. (2004)

- Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin and  $\beta$ -toxin. *J. Biol. Chem.* 279(1): 251-258.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G. and Day, N.P.J. (2002) Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70: 4987-4996.
- Perkins, S., Walsh, E.J., Deivanayagam, C.C., Narayana, S.V., Foster, T.J. and Hook, M. (2001) Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 276: 44721-44728.
- Plata, K., Rosato, A.E. and Wegrzyn, G. (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochemica Polonica.* 56(4): 597-612.
- Portolano, B., Finocchiaro, R., Kaam, V., Riggio, V. and Maizon, D.O. (2007) Time-to-event analysis of mastitis at first-lactation in Valle del Belice ewes. *Livestock Science.* 110: 273-279.
- Proietti, P.C., Coppola, G., Bietta, A., Marenzoni, M.L., Hyatt, D.R., Coletti, M. and Passamonti, F. (2010) Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy. *J. Vet. Med. Sci.* 72(11): 1443-1448.
- Puacz, E., Ilczyszyn, W.M., Kosecka, M., Buda, A., Dudziak, W., Polakowska, D.W., Panz, T., Bialecka, A., Kasprowicz, A., Lisowski, A., Krukowski, K., Cuteri, V. and Miedzobrodzki, J. (2015) Clustering of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis strains from regions of Central-Eastern Poland based on their biochemical and genetic characteristics. *Polish J. of Vet. Sci.* 18(2): 333-342.
- Rupp, M.E., Han, J. and Gatermann, S. (1995) Hemagglutination by *Staphylococcus aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis. *Med. Microbiol. Immunol.* 184(1): 33-36.
- Sabat, A., Melles, D.C., Martirosian, G., Grundmann, H., Van Belkum, A. and Hryniewicz, W. (2006) Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1135-1138.
- Sahebnasagh, R., Saderi, H. and Owlia, P. (2014) The Prevalence of resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients by PCR method for detection of *mecA* and *nuc* genes Iranian. *J. Publ. Health.* 43(1): 84-92.
- Salasia, S.I.O., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D. and Prabawati, F. (2011) Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. *J. Vet. Sci.* 12(4): 353-361.
- Salasia, S.I.O., Haryanto, B.M., Suarjana, G.K., Purantoro, A., Hariyadi, M. (2001) The zoonotical potention of *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*: characterization of human, monkey and pig isolates in Bali. *J. Sain Vet.* XX(1): 48-53.
- Salasia, S.I.O., Khusnan, Z., Lammler, C. and Zschock, M. (2004) Comparative studies on phenotypic and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hessen in Germany. *J. Vet. Sci.* 5(2): 103-109.
- 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.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C. and Stephan, R. (2004) Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* 101: 101-110.
- Shinji, H., Yosizawa, Y., Tajima, A., Iwase, T. and Sugimoto, S. (2011) Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79(6): 2215-2223.



- Shivairo, R. M., Musalia, L. M. and Muleke, C. I. (2013) Ethno veterinary knowledge and practice among the pastoralists of Baringo District, Kenya. *J. of Biol, Agricult and Healthcare*. Online [www.iiste.org](http://www.iiste.org).
- Singh, R.S., Ravinder, K. and Yadav, B.R. (2011) Distribution of pathogenic factor in Staphylococcus aureus strains isolated from intra-mammary infection in cattle and buffaloes. *Indian J. of Biotechnol.* 10: 410-416.
- Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A. and Lammler, C. (2001) Characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78: 373-382.
- Straub, J.A., Hertel, C. and Hammes, W.P. (1999) A 23S rRNA-targeted Polymerase Chain Reaction-based system for detection of Staphylococcus aureus in meat starter cultures and dairy product. *J. Food. Prot.* 62: 1150-1156.
- Stutz, K., Stephan, R. and Tasara, T. (2011) SpA, ClfA, and FnbA Genetic Variations Lead to Staphaurex Test-Negative Phenotypes in Bovine Mastitis Staphylococcus aureus Isolates. *J. of Clin. Microbiol.* 49(2): 638-646.
- Sutra, L. and Poutrel, B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus *J. Med. Microbiol.* 40: 79-89.
- Tamarapu, S., McKillip, J.L. and Drake, M. (2001) Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Staphylococcus aureus in dairy products. *J. Food Prot.* 64: 664-668.
- Tang, J., Chen, J., Li, H., Zeng, P., and Li, J. (2013) Characterization of adhesin genes, Staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among Staphylococcus aureus strains isolated from different sources. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(9): 757-763.
- Thakker, M., Park, J., Carey, V. and Lee, J. (1998) Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66: 5183-5189.
- Todar K. 2005. Online Textbook of Bacteriology. [http://textbookofbacteriology.net/staph\\_5.html](http://textbookofbacteriology.net/staph_5.html). download, 2 Januari 2014.
- Tuchscher, L.P.N., Gomez, M.I., Buzzola, F.R., Calvino, L.F., Lee, J.C. and Sordelli, D.O. (2007) Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of Staphylococcus aureus. *Infect. and Immunity.* 75(11): 5483-5488.
- Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaue, C. and Hermans, K. (2006) International dissemination of a high virulence rabbit Staphylococcus aureus clone. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 53: 418-422.
- Wibawan, I.W.T., Lämmler, C., Seleim, R.S. and Pasaribu, F.H. (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.
- Widianingrum, D.C., Windria, S. and Salasia, S.I.O. (2016) Antibiotic resistance and methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine, crossbred Etawa goat and human. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 11: 122-129.
- Yang, F.L., Li, X.S., Liang, X.W., Zhang, X.F., Qin, G.S. and Yang, B.Z. (2012) Detection of virulence-associated genes in Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1821-1826.
- Zecconi, A. and Hahn, G. (2000). Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk. *Bull. IDF.* 345: 15-18.