

Deteksi Hemagglutinin, Hemolisin dan Koagulase Secara Fenotipik dan Genotipik pada *Staphylococcus aureus* Isolat Asal Broiler

Phenotypic and Genotypically Detection of Haemagglutinin, Haemolysin and Coagulase of Staphylococcus aureus Isolated from Broiler

Khusnan*, Dwi Kusmanto, Agus Purnomo
Akademi Peternakan Brahmputra, Jl. Ki Ageng Pemanahan, Nitikan,
Sorosutan Umbulharjo Yogyakarta, Tlp. 0274-384370,
*E-mail: khusnanzaini@gmail.com

Naskah diterima : 19 Juli 2017, direvisi : 3 April 2018, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium causing diseases in animals and human. *Staphylococcus aureus* in broilers cause septicemia, tendosinovitis, dermatitis, endocarditis, wound infections, arthritis and bumblefoot. In this research, 24 isolates of *Staphylococcus aureus* from broiler were characterized of its virulent factors including the presence of haemagglutinin, the ability of plasma coagulase, precipitation formation and haemolysis types. By polymerase chain reaction (PCR) were genotypically detected genes *coa*, *clf*, *hlaA*, and *hlaB*. All of the isolates (100%) had haemagglutinin, capable to agglutinate and precipitate of rabbit plasma. All isolates could lyse sheep erythrocytes with the type of α -hemolysis (45.8%), β -hemolysis (50.0%) and γ -haemolysis (4.2%). Genotypically, all isolates (100%) had *coa* and *clf* genes, *hlaA* gene 7(0.8%) and *hlaB* gene (29.2%).

Key words: *Staphylococcus aureus*, broiler, coagulase, hemolysin, haemagglutinin

Abstrak

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab penyakit pada hewan dan manusia. Pada broiler *Staphylococcus aureus* menyebabkan septisemia, tendosinovitis, dermatitis, endokarditis, infeksi luka kulit dan artritis serta bumblefoot. Pada penelitian ini 24 isolat *Staphylococcus aureus* asal broiler dilakukan karakterisasi faktor virulen secara fenotipik meliputi keberadaan hemagglutinin, kemampuan koagulase plasma, terbentuknya presipitasi dan sifat hemolisis. Secara genotipik digunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi gen *coa*, *clf*, *hlaA* serta *hlaB*. Semua isolat *Staphylococcus aureus* (100%) memiliki hemagglutinin, mampu menggumpalkan dan mempresipitasi plasma kelinci. *Staphylococcus aureus* mampu melisiskan eritrosit domba dengan membentuk α -hemolisis (45,8%), β -hemolisis (50,0%) dan γ -hemolisis (4,2%). Secara genotipik semua isolat (100%) memiliki gen *coa* dan *clf*, 70,8% isolat memiliki gen *hlaA* dan 29,2% gen *hlaB*.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, broiler, koagulase, hemolisin, hemagglutinin

Pendahuluan

Infeksi *Staphylococcus aureus* telah menjadi masalah dalam industri peternakan unggas (McNamee dan Smyth, 2000), karena menyebabkan kerugian ekonomi (Aziza *et al.*, 2013). Pada ayam potong menyebabkan angka kematian tinggi, menghambat pertumbuhan dan adanya peningkatan biaya pengobatan (Rasheed, 2011). Pada broiler,

Staphylococcus aureus menyebabkan bumblefoot, artritis, septisemia dan tendosinovitis (Vanderhaeghen *et al.*, 2010).

Staphylococcus aureus dalam proses infeksi sampai muncul gejala penyakit ditentukan oleh beragam faktor virulensi yang dimiliki, baik secara fenotip maupun genotip (Gordon dan Lowy, 2008). Secara fenotip faktor virulensi *Staphylococcus aureus* di antaranya kemampuan koagulase, hemolisis dan

hemaglutinasi serta keberadaan kapsul polisakarida (de los Santos *et al.*, 2014). Secara genotip virulensi bergantung pada gen-gen virulensi (Diep dan Otto, 2008), dan banyak gen-gen yang mengatur virulensi pada *Staphylococcus aureus* (Bronner *et al.*, 2004), diantaranya gen *coa* sebagai gen koagulase (Aslantas *et al.*, 2007), gen *clf* sebagai gen *clumping factor* (Vaudaux *et al.*, 1995), serta gen *hlaA* dan gen *hlaB* sebagai gen hemolisin (Peacock *et al.*, 2001).

Tujuan penelitian ini mendeteksi keberadaan hemaglutinin secara fenotip, karakter hemolisin, faktor koagulase dan *clumping factor* secara fenotip dan genotip pada *Staphylococcus aureus* isolat broiler dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 24 isolat yang telah diidentifikasi sebagai *Staphylococcus aureus* (Khusnan dan Kusmanto, 2014). Karakterisasi faktor virulensi secara fenotip dilakukan uji keberadaan hemaglutinin, karakter hemolisis, uji faktor koagulase dengan koagulase tabung serta uji *clumping factor* secara genotip dilakukan deteksi gen *coa*, *clf*, *hlaA* dan *hlaB*.

Uji keberadaan hemaglutinin

Keberadaan hemaglutinin didasarkan kemampuan *Staphylococcus aureus* dalam mengaglutinasi eritrosit seperti yang dilakukan Wibawan *et al.* (1992). Digunakan darah kelinci dengan antikoagulan 0,2 M Sodium Sitrata pH 5,2, disentrifus dan dicuci dua kali dengan 0,15 M NaCl, endapan yang berisi eritrosit kemudian dilarutkan menjadi 2% dengan NaCl. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan 20 L larutan bakteri yang telah ditentukan *optical density*-nya dengan spektrofotometer transmisi dan 620 nm (kira-kira 10^9 bakteri/mL 0,15 NaCl) dengan 20 L larutan eritrosit di

atas gelas obyek. Gelas obyek digoyang selama 30 detik dan reaksi hemaglutinasi dicatat dengan ketentuan sebagai berikut: reaksi kuat, reaksi sedang dan tidak ada reaksi

Keberadaan faktor koagulase secara fenotip dilakukan dengan:

a. Uji koagulase tabung. Uji ini dilakukan sesuai yang dikerjakan Bruckler *et al.* (1994), dengan menggunakan plasma kelinci sebanyak 0,5 mL dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL larutan bakteri dari media media *Todd Hewitt Broth* (THB), diinkubasi selama 6-18 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada jam ke-6 dan dilanjutkan setelah jam ke-18. *Staphylococcus aureus* akan menunjukkan reaksi positif pada uji koagulase yang ditandai dengan terjadinya gumpalan dalam tabung. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gumpalan dalam tabung.

b. Uji *clumping factor*. Uji ini dilakukan dengan sesuai yang dikerjakan Bruckler *et al.* (1994), mencampurkan 2 tetes plasma kelinci dan 2 tetes isolat *Staphylococcus aureus* dari biakan THB pada gelas obyek. Uji *clumping factor* positif apabila terjadi presipitat dari pencampuran tersebut.

Keberadaan hemolisin

Uji ini secara fenotip dilakukan seperti yang dikerjakan oleh de los Santos *et al.* (2014). Isolat *Staphylococcus aureus* ditanamkan pada pelat agar darah domba steril 5% (agar base, Oxoid, Jerman). Pelat diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Zona hemolisis yang terbentuk di sekitar koloni dievaluasi dan dibandingkan dengan standar hemolisis (Microbeonline, 2013).

Deteksi secara genotip,

Untuk gen koagulase (*coa*), *clumping factor* (*clf*), gen hemolisin (*hlaA* dan *hlaB*) menggunakan teknik

polymerase chain reaction (PCR) seperti yang dikerjakan Salasia *et al.* (2011).

Preparasi DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) *Staphylococcus aureus* dipreparasi dengan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman). Karakterisasi *Staphylococcus aureus* terhadap gen 23SrRNA dengan menggunakan primer spesies spesifik. Bakteri ditanam pada plat agar darah selama 24 jam pada suhu 37°C, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8, yang mengandung 5 µL lysostaphin (1.8 U/µL; Sigma). Setelah inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 µl of proteinase K (14,8 mg/mL; Sigma) dan 200 µL of buffer AL (yang berisi reagen AL1 and AL2). Suspensi bakteri diinkubasi (3 menit pada suhu 70°C dan selama 10 menit pada suhu 95°C), kemudian setelah disentrifus beberapa detik, sebanyak 420 µL etanol

ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan kedalam kolom *QIAamp*. Setelah sentrifugasi selama 1 menit kolom *QIAamp* ditempatkan diatas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 µL (Qiagen). Kolom *QIAamp* kemudian disentrifus selama 3 menit, kolom kemudian ditempatkan diatas 2 ml tabung *Eppendorf* dan DNA yang ada pada kolom dicuci dua kali dengan cara elusi dengan 200 µL buffer AE. Hasil elusi sampel DNA dapat disimpan pada suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2004).

Amplifikasi gen *coa*, *clf*, *hlaA* dan *hlaB* *Staphylococcus aureus*

Deteksi gen *coa*, *clf*, *hlaA* dan *hlaB* melalui amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Identifikasi gen-gen tersebut pada isolat *Staphylococcus aureus* ditentukan dengan menggunakan primer spesifik (Tabel 1)

Tabel 1. Primer spesifik untuk gen-gen 23SrRNA, gen *coa*, gen *clf*, gen *hlaA* dan gen *hlaB*

Target gen	Sequence (5'-3')	PCR Program
23S rRNA	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	Akineden <i>et al.</i> (2001)
<i>coa</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	Baba <i>et al.</i> (2002)
<i>clf</i>	GGC TTC AGT GCT TGT AGG TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	Boerema <i>et al.</i> (2006)
<i>hlaA</i>	GGT TTA GCC TGG CCT TC CAT CAC GAA CTC GTT CG	Ferens <i>et al.</i> (1998)
<i>hlaB</i>	GCC AAA GCC GAA TCT AAG GCG ATA TAC ATC CCA TGG C	Ferens <i>et al.</i> (1998)

Agarose Gel Electrophoresis

Sebanyak 10 µL produk PCR dicampur dengan ±3 µL *loading buffer*, kemudian dielektroforesis menggunakan agarose 1% pada tegangan 100 V selama 30 menit, *band* DNA pada agar diwarnai dengan larutan *ethidium bromide* dan divisualisasikan menggunakan UV *transilluminator*. Besarnya amplikon ditentukan dengan menggunakan marker DNA dan besar amplikon untuk gen-gen tersebut sesuai dengan Salasia *et al.* (2011).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini 24 isolat *Staphylococcus aureus* asal broiler pada uji hemaglutinasi (100%) memiliki hemaglutinin, seperti (Gambar 1). dan pada uji hemolisis menunjukkan 45,8% (α -hemolisis), 50,0% (β -hemolisis) dan 4,2% (γ -hemolisis), (Gambar 2). Pada uji koagulase tabung semua isolat (100%) menggumpalkan plasma kelinci, (Gambar 3), dan pada uji *clumping factor* semua isolat (100%) terbentuk presipitat, (Gambar 4). Secara genotip semua isolat (100%) memiliki gen *coa* dan gen *clf* serta 70,8%

terdeteksi memiliki gen *hlaA* dan 29,2% memiliki gen *hlaB*, seperti tersaji pada Tabel 2.

Uji koagulase tabung, uji *clumping factor* serta deteksi gen *coa* dan gen *clf* dengan aplikasi PCR merupakan teknik kombinasi yang cepat dan akurat untuk identifikasi virulensi *Staphylococcus aureus* (Mohamed *et al.*, 2017). Uji-uji ini penting dilakukan untuk menentukan tingkat virulensi *Staphylococcus aureus* (Mohajeri *et al.*, 2016; Rusenova dan Rusenov, 2017). Pada penelitian ini pada semua isolat menggumpalkan plasma kelinci, membentuk presipitat dan memiliki gen *coa* dan gen *clf*.

Proses infeksi *Staphylococcus aureus*, pertahanan bakteri terhadap fagositosis dan tingkat keparahan penyakit inang dipengaruhi oleh banyak faktor virulen dan sangat kompleks (Diep dan Otto, 2008), di antaranya faktor-faktor yang berhubungan dengan kolonisasi dan adesi (Foster dan Höök, 1998), dan faktor yang berperan pada pertahanan terhadap kekebalan sel-sel fagosit inang (Haveri *et al.*, 2008), serta faktor yang menyebabkan tingkat keparahan gejala penyakit (Dinges *et al.*, 2000).

Enzim koagulase yang dimiliki *Staphylococcus aureus* merupakan faktor virulensi yang berperan menggumpalkan plasma darah (Babu *et al.*, 2014). Secara *in vitro* dibuktikan dengan uji koagulase tabung menggunakan plasma kelinci, sehingga terbentuk seperti gel (Aslantas *et al.*, 2007). *Staphylococcus aureus* yang memiliki enzim koagulase lebih patogen dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus* mutan dengan inaktivasi dengan koagulase (Moreillon *et al.*, 1995). Inaktivasi atau netralisasi enzim koagulase dapat menghilangkan sifat patogenesis *Staphylococcus aureus* (McAdow *et al.*, 2012).

Secara genotip kemampuan koagulase diatur dengan gen *coa* (Tiwari *et al.*, 2008), keberadaan gen *coa* ini merupakan faktor virulensi yang penting pada *Staphylococcus aureus* (Babu *et al.*, 2014). Gen *coa*

merupakan gen adhesin pada *Staphylococcus aureus* yang berperan penting pada proses infeksi, yaitu berperan dalam kolonisasi dan invasi pada sel inang (Peacock *et al.*, 2002). Gen *coa* berperan dalam mekanisme pertahanan *Staphylococcus aureus* terhadap sel-sel fagositosis inang (Aarestrup *et al.*, 1995), yaitu dengan mengaktifkan protrombin sebagai anti fagositosis (Engleberg *et al.*, 2006), gen *coa* berperan menghalangi fagositosis oleh sel neutrofil inang maupun sel kekebalan lainnya (Guggenberger *et al.*, 2012), sehingga bakteri mampu bertahan hidup, akan memperbanyak diri dalam proses infeksi (Aarestrup *et al.*, 1995). Karakulska *et al.* (2011) melaporkan gen *coa* terdeteksi pada semua *Staphylococcus aureus* isolat asal sapi perah.

Clumping factor atau faktor penggumpal merupakan faktor virulensi pada *Staphylococcus aureus* (Perkins *et al.*, 2001), yang diatur oleh gen *clf* (Vancraeynest *et al.*, 2006), yang berperan sebagai faktor adhesin pada awal proses infeksi (Flick *et al.*, 2013), serta berperan pada pembekuan darah dan kerusakan sel permukaan inang (Moreillon *et al.*, 1995), dan menghambat proses fagositosis oleh makrofag (Higgins *et al.*, 2006). *Clumping factor* dilaporkan sering ditemukan pada sebagian besar isolat *Staphylococcus aureus* (Salasia *et al.*, 2004)

Pada penelitian ini 100% terdeteksi memiliki gen *clf*. Hasil ini sama dengan laporan Elsayed *et al.* (2015) dan Almeida *et al.* (2013) *Staphylococcus aureus* asal susu sapi dan kerbau serta domba 100% memiliki gen *clf*. Salasia *et al.* (2004) melaporkan 64,3% *Staphylococcus aureus* terdeteksi memiliki gen *clf*.

Hemolisin pada *Staphylococcus aureus* sebagai faktor virulensi penting yang berkontribusi pada proses invasi, meningkatkan keparahan penyakit dan perlindungan diri dari respon imun inang. Pada penelitian ini secara fenotip semua isolat *Staphylococcus aureus* memiliki hemolisin dengan

distribusi α -hemolisis (45,8%), β -hemolisis (50,0%) dan γ -hemolisis (4,2%). Secara genotip distribusi gen *hlaA* (70,8%) dan gen *hlaB* (29,2%).

Hasil penelitian ini secara fenotip berlawanan seperti yang dilaporkan Abdalrahman *et al.* (2015), yaitu distribusi α -hemolisis lebih banyak dari pada β -hemolisis. Secara umum distribusi α -hemolisis lebih banyak diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* isolat asal hewan (Ariyanti *et al.*, 2011). Distribusi α -hemolisis *Staphylococcus aureus* isolat asal sapi lebih besar daripada β -hemolisis (Cifrian *et al.*, 1996). Distribusi α -hemolisis lebih besar dari pada β -hemolisis pada *Staphylococcus aureus* yang berasal dari infeksi akut, sub akut maupun kronis (Tirpude dan Batra, 2012).

Hemolisin merupakan eksotoksin yang dimiliki *Staphylococcus aureus* (Moraveji *et al.*, 2014), yang berupa protease ekstraseluler (Kolar *et al.*, 2013). Hemolisin merupakan racun yang dapat melisiskan eritrosit dan pada pelat agar darah akan membentuk zona hemolisis (Bhakdi *et al.*, 1989). Hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Staphylococcus aureus* (Kolar *et al.*, 2013; dan berperan penting dalam patogenesis (Moraveji *et al.*, 2014), serta memberikan kontribusi menyebabkan tingkat keparahan penyakit (Da Silva *et al.*, 2005).

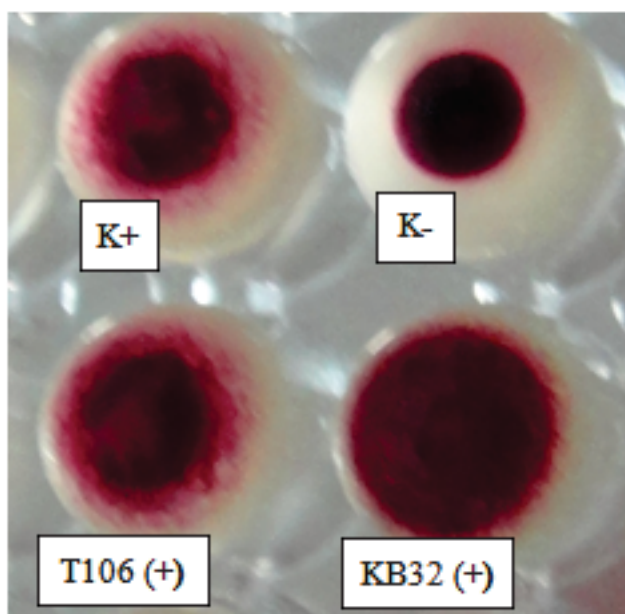
Tabel 2. Karakterisasi fenotip dan deteksi gen koagulase (*coa*), *clumping factor* (*clf*), *hlaA* dan *hlaB* pada *Staphylococcus aureus* isolat broiler

isolat	kode	fenotip					genotip				
		Hem aglu *	α	β	γ	KT **	clf ***	23S rRNA	<i>coa</i>	<i>clf</i>	<i>hlaA</i>
1	BFT120	+		+		+	+	+	+	+	+
2	BFT23	+	+			+	+	+	+	+	+
3	BFT24	+		+		+	+	+	+	+	+
4	KB31	+	+			+	+	+	+	+	+
5	KB32	+		+		+	+	+	+	+	+
6	KB62	+	+			+	+	+	+		+
7	KB63	+		+		+	+	+	+	+	
8	KB80	+		+		+	+	+	+	+	
9	KB81	+		+		+	+	+	+	+	
10	M3	+		+		+	+	+	+	+	
11	M5	+		+		+	+	+	+		+
12	T106	+		+		+	+	+	+	+	
13	T103	+		+		+	+	+	+	+	
14	T104	+		+		+	+	+	+	+	
15	BF6	+	+			+	+	+	+		+
16	BF9	+	+			+	+	+	+		+
17	BF16	+		+		+	+	+	+	+	
18	K10	+	+			+	+	+	+		
19	K13	+	+			+	+	+	+	+	
20	Art4	+			+	+	+	+	+		
21	Art6	+	+			+	+	+	+	+	
22	Art7	+	+			+	+	+	+	+	+
23	Art9	+	+			+	+	+	+	+	
24	Art11	+	+			+	+	+	+	+	

*hemaglutinasi ** koagulase tabung ****clumping factor*

Hemolisin berperan dalam meningkatkan permeabilitas sel, sehingga sel lebih rentan terhadap agen infeksi (Park *et al.*, 2004), dan berperan dalam perlekatan pada sel inang serta mempercepat penetrasi bakteri pada sel inang (Fiaschi *et al.*, 2016), serta mempunyai kemampuan melisis sel darah merah (Bhakdi *et al.*, 1989). Hemolisin berperan dalam pertahanan diri terhadap respon imun inang (Da Silva *et al.*, 2005), dan berperan dalam menghancurkan berbagai sel imun, seperti monosit (Bhakdi *et al.*, 1989), dan makrofag (Kolar *et al.*, 2013).

Tingkat virulensi *Staphylococcus aureus* tergantung kepada jenis produksi hemolisin, menurut Leitner *et al.* (2003) tingkat virulensi hemolisin berturut-turut α -hemolisin, β -hemolisin kemudian γ -

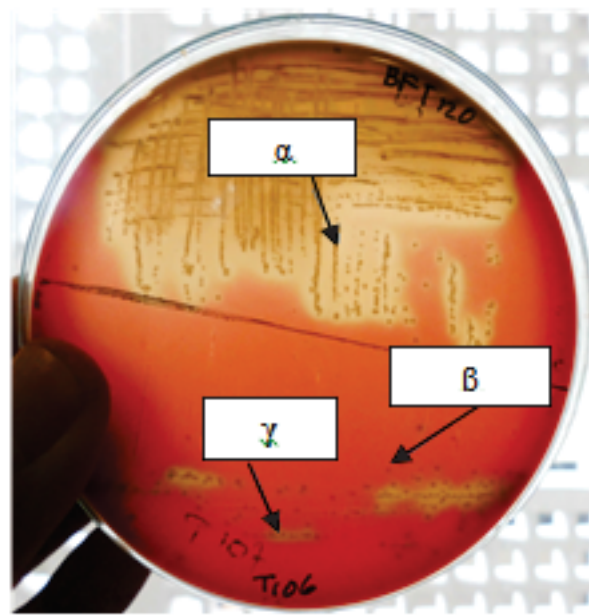


Gambar 1. Uji hemaglutinasi pada *S. aureus*
(K-)=kontrol negatif eritrosit mengendap
(K+)=kontrol positif terjadi hemaglutinasi

Menurut Dinges *et al.* (2000) α -hemolisin memiliki peran hemolitik, dermonekrotik dan neurotoksik, sedangkan β -hemolisin merupakan sphingomyelinase yang berperan dalam melisis eritrosit (Larsen *et al.*, 2002). Secara genotip hemolisin pada *Staphylococcus aureus* dikodekan sebagai gen

hemolisin. α -hemolisin dan β -hemolisin sebagai faktor virulensi yang penting pada *Staphylococcus aureus* (Burnside *et al.*, 2010), yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan berperan dalam peradangan sampai nekrosis epitel pernafasan (Hayashida *et al.*, 2009).

Secara fenotip dengan menggunakan media agar darah hemolisin *Staphylococcus aureus* akan membentuk zona hemolisis spesifik yang dapat diidentifikasi sebagai α -hemolisis, β -hemolisis, γ -hemolisis dan δ -hemolisis (Burnside *et al.*, 2010). α -hemolisin merupakan hemolitik, dermonekrotik dan aktivitas neurotoksik dan dianggap utama faktor patogenitas *Staphylococcus aureus* (Dinges *et al.*, 2000). β -hemolisin adalah sphingomyelinase yang menyebabkan lisisnya eritrosit (Larsen *et al.*, 2002).



Gambar 1. Pertumbuhan koloni *S. aureus* pada media agar darah terjadi zona hemolisis α -hemolisin (Kb62) β -hemolisin (T106) γ -hemolisis (Art4)

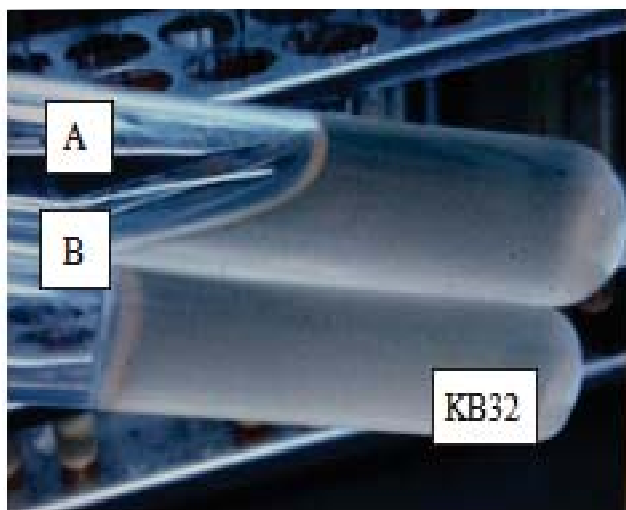
hlaA dan gen *hlaB* (Kumar *et al.*, 2011). Pada penelitian ini dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) diperoleh hasil semua isolat memiliki gen hemolisin, dengan distribusi gen *hlaA* (70,8%) dan gen *hlaB* (29,2%), dengan amplicon gen *hlaA* (704bp) dan *hlaB* (496bp). Hasil penelitian ini menunjukkan

distribusi gen *hlaA* lebih tinggi dari pada gen *hlaB*. Distribusi gen *hlaA* lebih tinggi dari pada gen *hlaB* telah dilaporkan Delgado *et al.* (2011) dan Almeida *et al.* (2013). Abdalrahman *et al.* (2015) melaporkan distribusi gen *hlaA* dan *hlaB* pada *Staphylococcus aureus* isolat asal bangsa burung sebesar 75,6% dan 41,7%, pada anak ayam 81,2% dan 38,2%, pada kalkun sebesar 67,2% dan 46,3%

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak ada hubungan antara distribusi hemolisis secara fenotip dengan genotip. Secara fenotip α -hemolisis (45,8%), β -hemolisis (50,0%) dan γ -hemolisis (4,2%), tetapi secara genotip gen *hlaA* (70,8%) dan gen *hlaB* (29,2%). Perbedaan distribusi karakter hemolisis pada *Staphylococcus aureus* antara fenotip dan genotip telah dilaporkan oleh Fei *et al.* (2011) bahwa distribusi α -hemolisis secara fenotip (43,4%) dan secara genotip gen *hlaA* (88%), sedangkan β -hemolisis (43%) dan gen *hlaB* (42,6%). Adanya perbedaan distribusi antara fenotip dan genotip mungkin dipengaruhi oleh banyak

faktor, di antaranya karena mutasi gen (Ariyanti *et al.*, 2011).

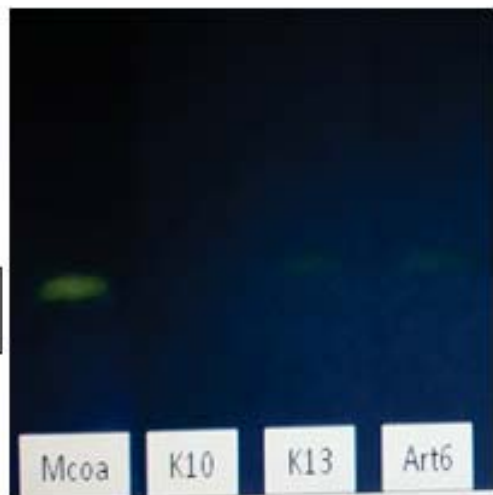
Pada uji hemaglutinasi semua isolat *Staphylococcus aureus* menggumpalkan eritrosit kelinci, artinya semua isolat *Staphylococcus aureus* yang diteliti memiliki hemaglutinin. Hemaglutinin dari *Staphylococcus aureus* itu ditentukan berdasarkan *haemagglutination reaction* (Salasia dan Laemmler, 1995). Hemaglutinin merupakan protein permukaan dan berperan sebagai adesi *Staphylococcus aureus* (Rares, 2011). Hemagutinin merupakan faktor virulensi pada *Staphylococcus aureus*, yaitu mempermudah *Staphylococcus aureus* untuk beradesi pada sel jaringan inang (Gatermann *et al.*, 1992) dan perlekatan bakteri pada permukaan sel darah merah (Abrar *et al.*, 2013), dan berperan awal pada proses infeksi (Harshini, 2015). Keberadaan hemaglutinin pada *Staphylococcus aureus* dikaitkan dengan patogenesis (Rupp dan Archer, 1995).



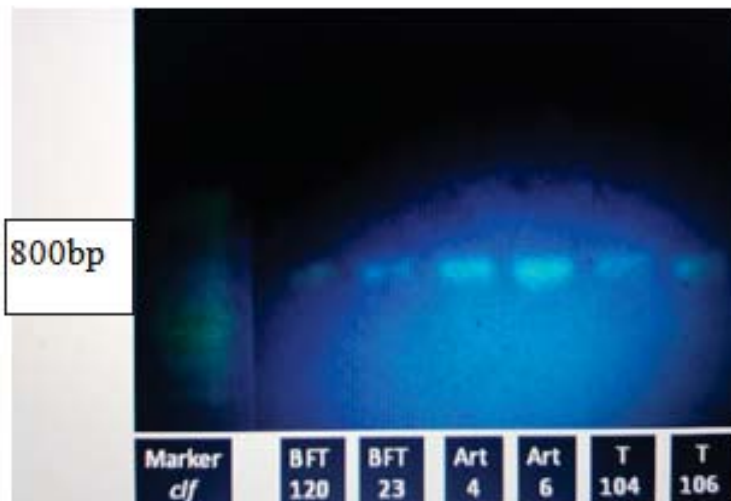
Gambar 3. Uji koagulase tabung menggunakan plasma kelinci (A)= tidak menggumpal (B)= terjadi penggumpalan



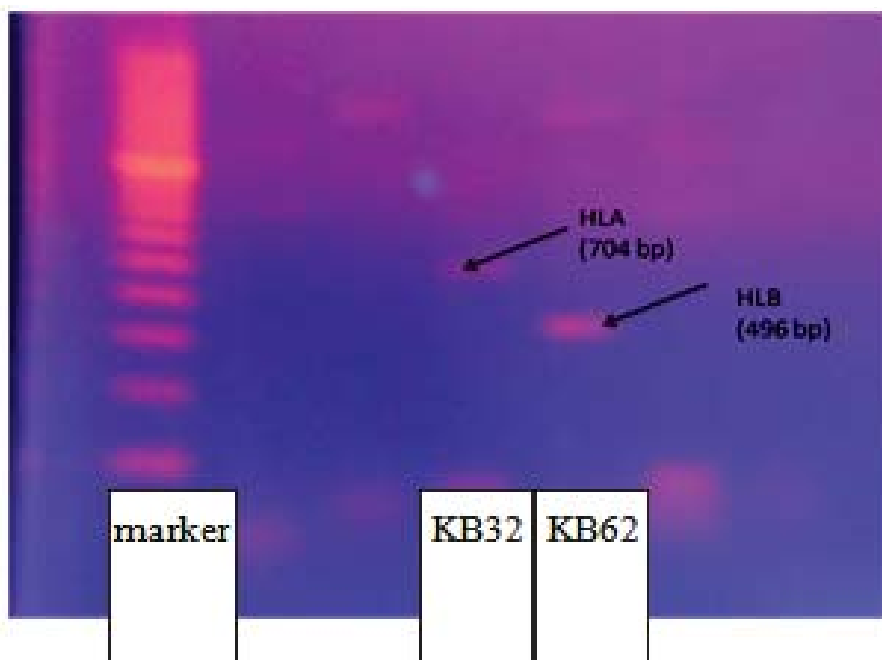
Gambar 4. Uji *clumping factor* menggunakan plasma kelinci (A)= terjadi presipitasi (B)= kontrol negatif



Gambar 5. Analisis gen *coa* (199bp) pada *S. aureus*



Gambar 6. Analisis gen *clf* (800bp) pada *S. aureus*



Gambar 7. Analisis gen *hlaA* (704bp) dan gen *hlaB* (496bp) pada *S. aureus*

Staphylococcus aureus memiliki banyak faktor virulensi yang berupa eksoprotein seperti eksotoksin dan enzim, diantaranya nuklease, protease, lipase, hialuronidase dan kolagenase serta koagulase yang semuanya dapat mempengaruhi tingkat patogenisitas (El-Hamid dan Bendary, 2013). Banyaknya faktor virulen yang dimiliki oleh *Staphylococcus aureus* dapat peningkatan tingkat virulensi sehingga menimbulkan kejadian penyakit yang lebih parah sampai menimbulkan kematian inang (Kolar *et al.*, 2013). Menurut Franco *et al.* (2008) bakteri yang memiliki banyak faktor virulen akan lebih

bersifat virulen dan dapat meningkatkan sifat patogenisitas bakteri karena virulensi *Staphylococcus aureus* bersifat multi faktorial. Patogenisitas *Staphylococcus aureus* merupakan proses yang kompleks dan melibatkan beragam faktor virulensi (Cotar *et al.*, 2010).

Kesimpulan

Berdasarkan faktor-faktor virulensi yang dideteksi *Staphylococcus aureus* isolat asal broiler bersifat virulen. Isolat-isolat tersebut terdeteksi memiliki hemaglutinin, memiliki hemolisin dan

memiliki faktor penggumpal secara fenotip maupun genotip.

Ucapan Terima Kasih

Publikasi ini merupakan sebagian dari hasil Penelitian Fundamental yang dibiayai oleh DP2M Dikti Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan tahun anggaran 2011-2012. Kepada: Arisa Diana Ekawati, Dianita Dwi Sugiartini, Eka Yanuarti dan Imam Hanafi diucapkan terimakasih atas bantuannya.

Daftar Pustaka

- Aarestrup, F.M., Dangler, C.A. and Sordillo, L.M. (1995) Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Can. J. Vet. Res.*, 59:124-128.
- Abdallahman, L.S., Stanley, A., Wells, H. and Fakhr, M.K. (2015) Isolation, virulence, and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains from Oklahoma retail poultry meats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 12: 6148-6161.
- Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M. and Pasaribu. F.H. (2013) *Role of Staphylococcus aureus haemagglutinin in adhesion process on udder epithelial cells. J. Kedokteran Hewan*, 7(1): 43-46.
- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Laemmler, C., Wolter, W. and Zschöck, M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, 8: 959-964.
- 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. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(2):493-498.
- Ariyanti, D., Salasia, S.I.O. and Tato, S. (2011) Characterization of haemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal Origin. *Indon. J. of Biotech.*, 16(1): 32-37.
- Aslantas, O., Demir, C., Turutoglu, H., Cantekin, S., Ergun, Y. and Dogruer, G. (2007) Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from sub clinical mastitis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31:253-257.
- Aziza, A.M.S., Akter, M.R., Rahaman, M.S., Mas, K., Zakm, H., Jahan, M.S. and Kabir, L.S.M. (2013) Isolation, identification and antibiogram profiles of *Staphylococcus aureus* from commercial broiler flocks in Dinajpur District of Bangladesh with special focus on the determination of lethal effect of extracted toxin. *Sci. J. of Microbiol.* 2(4): 74-82.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K. and Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 359: 1819-1827.
- Babu, N.G.R., Shree G.B.B., Rekha L. and Karthiga P. (2014) Molecular analysis of coagulase (coa) gene polymorphism in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. *Int. J. of Innov. Res. in Sci., Eng. and Technol.*, 8162-8168.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. and Hugo, F. (1989) Release of interleukin-1 associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect. Immun.*, 57: 3512-3519.
- Boerema, J.A, Clemens, R. and Brightwell, G. (2006) Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 192-201.
- Bronner, S., Monteil, H. and Prevost, G. (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28(2): 183-200.
- Brückler, J., Schwarz, S. and 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., Nguyen-Thao, B., Connelly, J.E., Wan-Jung, L., 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. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011071>
- Cifrian, E., Guidry, A.J., Bramley, A.J., Norcross, N.L., Bastida-Corcuera, F.D. and Marquardt, W.W. (1996) Effect of staphylococcal alpha toxins on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 48:187-198.
- Cotar, A.I., Chifiriuc, M.C., Dinu, S., Bucur, M., Iordache, C., Banu, O., Dracea, O., Larionand, C. and Lazar, V. (2010) Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections. *Int. J. Mol. Sci.*, 11(12): 5273-5291.
- Da Silva, R.E., Boechat, J.U.D., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., Sequera, A.P.S. and Da Silva N. (2005) Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian Dairy Herd. *Sci. Small rum. res.*, 56: 271-275.
- De los Santos, Fernández, 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.
- Delgado, S., Garcia P., Fernandez, L., Jimenez, E., Rodriguez-Banos, M., Del Campo, R. and Jrodriguez, J.M. (2011) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *Immunol. Med. Microbiol.*, 62: 225-235.
- Diep, B.A. and Otto, M. (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends in Microbiol.*, 16(8): 361-369.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 16-34.
- El-Hamid, M.I.A. and Bendary, M.M. (2013) Association between agr alleles and toxin gene profiles of *S. aureus* isolates from human and animals sources in Egypt. *Int. J. of Adv. Res.*, 1(8): 133-144.
- Elsayed, M.S., El-Bagoury, A.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.
- Engleberg, N.C., DiRita, V. and Dermody, T.S. (2006) *Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease*. Fourth edition. Chapter 11: 147-155.
- Fei, W., Hongjun, Y., Hong-bin, H., Changfa, W., Yundong, G., Qifeng, Z., Xiaohong, W. and Yanjun, Z. (2011) Study on the haemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandog dairy farms. *Int. J. Appl. Res. Vet. M.*, 9(4): 416-421
- Ferens, W.A., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Park, Y.H., Deobald, C.F. and Fox, L. (1998) Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66: 573-580.
- Fiaschi, L., Di Palo, B., Scarselli, M., Pozzi, C., Tomaszewski, K., Galletti, B., Nardi- Dei, V., Arcidiacono, L., Mishra, R.P.N., Mori, E., Pallaoro, M., Falugi, F., Torre, A., Fontana, M.R., Soriani, M., Wardenburg, J.B., Grandi, G., Rappuoli, R., Ferlenghi, I. and Bagnoli, F. (2016) Auto-assembling detoxified *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin mimicking the wild-type cytolytic toxin. *Clin. Vaccine Immunol.*, 23: 442-450.
- Flick, M.J., Du, X., Prasad, J.M., Raghu, H., Palumbo, J.S., Smeds, E., Hook, M. and Degen, J.L. (2013) Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor clfA improves host survival in septicemia. *Blood*. 121: 1783-1794.
- Foster, T.J. and Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6: 484-488.
- Franco, G.J.C., Gonzalez, V.L.G., 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, Art. 7. <http://www.redalyc.org/pdf/730/73011197007.pdf>
- Gatermann, S.G., Kreft, B., Marre, R. and Wanner, G. (1992) Identification and characterization of a surface-associated protein (ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* 60: 1055-1060.
- Gordon, R. and Lowy, F.C. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46: 350-359.
- Guggenberger, C., Wolz, C., Morrissey, J.A., and Heesemann, J. (2012) Two distinct coagulase-dependent barriers protect *Staphylococcus aureus* from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model. *PLoS Pathog.*, 8: e1002434 2012
- Harshini, A.K. (2015) Adhesion in Bacteria. *Int J. of Sci and res.*, 279-281.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyorala, S. (2008) Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 3728-3735.
- Hayashida, A., Bartlett A.H., Foster T.J. and Park P.W. (2009) *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* 174: 509-518.
- Higgins J., Loughman, A., van Kessel, K.P.M., van Strijp, A.G. and Timothy, J. (2006) Foster clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 258: 290-297.
- Karakulska, J., Pobucewicz, A., Nawrotek, A., Muszyńska, M., Furowicz, A.J. and Furowicz D.C. (2011) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR-RFLP of coa gene and RAPD analysis. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14: 285-286.
- Khusnan dan Kusmanto, D. (2014) *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolat ayam pedaging dan kajian virulensi pada sel hospes secara invivo dan invitro*. Laporan Penelitian Fundamental 2013-2014. Kemendikbud. Republik Indonesia
- Kolar, S.L., Ibarra, J.A., Rivera, F.E., Mootz, J.M., Davenport, J.E., Stevens, S.M., Horswill, A.R. and Shaw, L.N. (2013) Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence determinant stability. *Microbiol. Open.*, 2:18-34.
- Kumar, R., Yadav, B.R. and Singh, R.S. (2011) Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic sahiwal cattle. *J. Biosci* 36(1):175-188.
- Larsen, H.D., Aarestrup, F.M. and Jensen, N.E. (2002) Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet. Microbiol.*, 85: 61-67.
- Leitner, G., Krifucks, O., Glickman, A., Younis, A. and Saran, A. (2003) *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *Immunol. and Med. Microbiol.*, 35: 99-106.
- McAdow, M., Missiakas D.M. and Schneewind, O. (2012) *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J. Innate. Immun.*, 4: 141-148
- McNamee, P.T. and Smyth, J.A. (2000) Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head necrosis) of broiler chickens: a review. *Av. Pathol.* 29(5): 477-495.
- Microbeonline (2013) Blood Agar: Composition, preparation, uses and types of hemolysis. <http://microbeonline.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-types-of-hemolysis>
- Mohajeri, P., Azizkhani, S., Farahani, A. and Norozi, B. (2016) Genotyping of coa and aroA Genes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Nasal Samples in Western Iran. *Jundishapur J. Microbiol.*, 9(1): e26460
- Mohan, K., Shroeder-Tucker, L.C., Karenga, D., Dziva, F., Harrison, A. and Muvavarirwa, P. (2002) Un-identified Coryne form Bacterial strain from cases of polyarthritis in chickens:

- phenotype and fatty acid profile. *Avian Dis.* 46:1051-1054.
- Mohamed, S.R., Habashy, H.F., El-Shahawy, H.S. and Salem, N.I.E. (2017) Phenotype and genotype characterization of staphylococcus aureus causing sub clinical mastitic cattle milk using vitek2 compact system and PCR. *An. Health Res. J.* 5(1): 86-96.
- Moreillon, P., Entenza, J.M., Francioli, P., Mcdevitt, D., Foster, T.J., Francois, P. and Vaudaux, P. (1995) Role of Staphylococcus aureus coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Am. Soc. for Microbiol. Infect. and Immun.*, 63: 4738-4743.
- 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* α -toxin and β -toxin. *J. Biol. Chem.* 279(1): 251-258.
- Peacock, S.J., de Silva, I. and Lowy, F.D. (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol.*, 9: 605-610.
- 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.
- Rares, F.E.S. (2011) Deteksi hemagglutinin protein permukaan Staphylococcus aureus dengan menggunakan eritrosit Rattus novergicus strain wistar. *J. Biomedik*, 3(3): 156-164. (abstract)
- Rasheed, B.Y. (2011) Isolation and identification of bacteria causing arthritis in chickens *Iraqi J. of Vet. Sci.*, 25(2): 93-95.
- Rupp, M.E. and Archer, G.L. (1995) Hemagglutination and adherence to plastic by Staphylococcus epidermidis. *Infect. Immun.*, 60: 4322-432.
- Rusenova, N.V. and Rusenov, A.G. (2017) Detection of Staphylococcus aureus among coagulase positive staphylococci from animal origin based on conventional and molecular methods. *Mac. Vet. Rev.*, 40(1): 29-36.
- Salasia, S.I.O. and Laemmler, C. (1995) Occurrence of haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med. Sci. Res.* 22: 763-764.
- 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., Khusnan, Z., Laemmler, 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 Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.*, 5(2): 103-109.
- Tirpude, R.J. and Batra, H.V. (2012) Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from acute, sub-acute and sub-clinical staphylococcosis in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 20: 215-221.
- Tiwari, H.K., Sapkota, D. and Sen, M.R. (2008) Evaluation of different tests for detection of Staphylococcus aureus using coagulase (coa) gene PCR as the gold standard. *Nepal Med. Coll. J.*, 10(2): 129-131.
- Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaue, C. and K. Hermans K. (2006) International Dissemination of a High Virulence Rabbit *Staphylococcus aureus* Clone. *J. Vet. Med.*, 53(9): 418-422.
- Vaudaux, P.E., François, P., Proctor, R.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Albrecht, R.M, Lew, D.P., Wabers, H. and Cooper, S.L. (1995) Use of adhesion-defective mutants of Staphylococcus aureus to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect. Immun.*, 63(2): 585-590.
- Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Butaye, P. (2010) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food production animals. *Epidemiol. Infect.*, 138: 606-625.
- Wibawan, I.W.T., Laemmler, C. and Pasaribu, F.H. (1992) A hemagglutinating adhesion of group B Streptococci isolates from cases of bovine mastitis mediated adherence to Hela Cell. *J. Gen Microbiol.*, 139: 2173-1242.