

Deteksi *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus sp.* secara Langsung dari Susu Segar Kambing Peranakan Etawa dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Detection of Staphylococcus aureus and Staphylococcus sp. Direct From Raw Milk of Etawa Goat with Polymerase Chain Reaction (PCR)

Fatkhanuddin Aziz¹, Fajar Budi Lestari¹, Sarah Nuraida S.², Endah Purwati², Siti Isrina Oktavia Salasia^{3*}

¹Program Studi D3 Kesehatan Hewan, Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

³Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

*Corresponding Author; Email: isrinasalasia@yahoo.com

Naskah diterima: 27 Januari 2020, direvisi: 4 Maret 2020, disetujui: 30 Juli 2020

Abstract

The genus of *Staphylococcus* is one of the bacterial pathogens that cause mastitis causing economic losses in Etawa crossbreed goat. Among *Staphylococcus sp.* which can grow well in raw milk, *Staphylococcus aureus* is known causing foodborne disease in human because of its ability to produce enterotoxins that are resistance to digestive enzymes or heating treatment. The purpose of this study was to detect *Staphylococcus sp.* and *S. aureus* directly from raw milk of Etawa crossbreed goat using PCR. The study was carried out by extracted DNA from fresh milk using spin column method and then amplified specific 23S rRNA for *Staphylococcus sp.* and *S. aureus*. PCR examination revealed that 37 (61%) and 1 (1,6%) raw milk samples were positive for *Staphylococcus sp.* and *S. aureus* respectively. The PCR Method is useful to reduce deflection time of *Staphylococcus sp.* contaminants.

Key words: Goat; PCR; raw milk; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus sp.*

Abstrak

Genus *Staphylococcus* merupakan salah satu patogen bakteri penyebab mastitis yang menyebabkan kerugian ekonomi pada kambing Peranakan Etawa. *Staphylococcus sp.* yang dapat mencemari susu segar adalah *Staphylococcus aureus* sehingga membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi (*food borne disease*) karena kemampuannya dalam memproduksi enterotoksin yang tahan terhadap enzim pencernaan maupun pemanasan. Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* secara langsung dari susu kambing peranakan etawa dengan teknik PCR. Metode yang dilakukan adalah mengekstraksi DNA dari 60 sample susu segar dengan prinsip *spin column-based nucleic acid purification* dan kemudian dilakukan amplifikasi gen spesifik 23S rRNA *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus*. Hasil PCR diketahui 37 (61%) sampel susu positif identifikasi *Staphylococcus sp.* dan hanya 1 (1,6%) sampel *S. aureus*. Metode deteksi dengan PCR dapat digunakan untuk mendeteksi kontaminan *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* dengan waktu yang singkat.

Kata kunci: Kambing; PCR; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*

Pendahuluan

Kambing Peranakan Etawa (PE) merupakan salah satu ternak *indigenous* di Indonesia yang mempunyai potensi genetik tinggi sebagai penghasil daging maupun susu, serta mampu menghasilkan anak lebih dari satu ekor setiap kelahiran (Budisatria *et al.* 2019). Produksi susu yang dihasilkan mampu meningkatkan kesejahteraan masyarakat melalui penjualan susu segar dengan kisaran harga Rp.20.000-Rp.30.000 per liter.

Susu merupakan media pertumbuhan yang baik bagi bakteri, sehingga bakteri patogen seperti genus *Staphylococcus* dapat tumbuh baik dimedia ini dan menyebabkan mastitis bagi kambing yang terinfeksi. Penelitian yang dilakukan oleh Haenlein (2002) mengungkapkan bahwa keberadaan *Staphylococcus sp.* dalam susu kambing normal yang terindikasi mastitis subklinis berkisar 59% diantaranya *Staphylococcus aureus* 17%, *S. epidermidis* 14%, *S. capitis* 13%, *S. hyicus* 11%. Hal tersebut sependapat dengan Contreras *et al.* (2007) dan Windria *et al.* (2016) yang mengemukakan bahwa *Staphylococcus sp.* merupakan *prevalent-pathogen* yang bertanggung jawab pada kasus mastitis pada ruminansia kecil.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan salah satu bakteri penyebab mastitis yang menyebabkan kerugian ekonomi pada peternakan kambing PE dan sapi perah (Salasia *et al.*, 2004; Purnomo *et al.*, 2006; Salasia *et al.*, 2011). Bakteri tersebut merupakan penyebab utama *contagious* mastitis (Pettersen-Wolfe *et al.*, 2010; Achek *et al.*, 2020). Kerugian ekonomi oleh mastitis berupa penurunan produksi susu, masa laktasi yang lebih pendek dan bertambahnya biaya pengobatan (Nielsen, 2009; Hayati *et al.* 2019). Purnomo *et al.* (2006) melaporkan bahwa 23,08% dari 52 sampel susu kambing PE asal Yogyakarta dan Purworejo Jawa Tengah yang diteliti positif ditemukan *S. aureus*. Penelitian yang dilakukan oleh Windria *et al.* (2016) diketahui 38,5% dari 52 sampel susu kambing PE yang diuji positif *Staphylococcus sp.*

Raw milk atau susu segar merupakan sumber utama munculnya *S. aureus* dalam produk susu. Proses higienisasi terutama pada proses pasteurisasi yang tidak sempurna merupakan salah satu penyebab *food borne disease* (penyakit yang disebabkan oleh mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri) pada

manusia (Tan dan Hogg, 2008; Fagundes *et al.*, 2010). Penelitian yang dilakukan oleh Salasia *et al.* (2011) diketahui adanya keberadaan gen-gen penyandi enterotoksin penyebab keracunan makanan pada *S. aureus* yang diisolasi dari susu segar yang berasal dari daerah Jawa Barat, Jawa Tengah dan Yogyakarta. Hal tersebut mengindikasikan adanya potensi *S. aureus* dalam susu yang dapat membahayakan konsumen.

Metode yang mudah diaplikasikan dalam mengidentifikasi keberadaan *S. aureus* dan *Staphylococcus* lainnya dari susu segar kambing PE yang mengalami mastitis diperlukan untuk mengontrol penyebaran penyakit yang disebabkan oleh Genus ini. Identifikasi bakteri patogen dari susu segar juga dapat dijadikan diagnosa definitif sumber keracunan pada makanan dan juga memberikan informasi penting sebagai tindakan preventif dan kontrol sumber keracunan pangan yang disebabkan oleh *S. aureus* (He *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2013).

Identifikasi *S. aureus* dan *Staphylococcus sp.* pada susu selama ini sebagian besar dilakukan dalam skala laboratorium dengan cara isolasi dan identifikasi mikroba secara konvensional menggunakan media selektif dan uji biokemis. Beberapa keterbatasan dari metode ini adalah kondisi pertumbuhan bakteri pada saat sampel susu diperiksa, sampel susu kemungkinan hanya mengandung jumlah bakteri yang sedikit atau bahkan kultur negatif, hal ini dimungkinkan karena adanya residu antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Phuektes *et al.*, 2001; Riffon *et al.*, 2001). Berdasarkan keterbatasan metode konvensional tersebut, maka teknologi molekular dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang lebih akurat dalam mengidentifikasi berbagai macam bakteri pada sampel susu. Penelitian ini bertujuan mendeteksi *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* secara langsung dari susu kambing PE menggunakan metode PCR.

Metode Penelitian

Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah susu segar yang diambil secara aseptis dari berbagai sentra penghasil susu kambing PE di koperasi susu asal Yogyakarta

dengan jumlah 60 sampel. Isolat *S. aureus* positif 23S rRNA dengan kode *American Type Culture Cell* (ATCC) 25923 milik Balai Besar Veteriner Wates, Kementerian Pertanian RI dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) 1629 milik Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM digunakan sebagai kontrol positif amplifikasi PCR untuk *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus*.

Ekstraksi DNA dari Susu Segar

Ekstraksi DNA langsung dari susu segar dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Aziz (2013) menggunakan *Qiamp tissue* kit (Qiagen, Jerman). Modifikasi minor dilakukan untuk mendapatkan pelet dengan sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm. Sebanyak 1 ml sampel susu segar dalam tabung *eppendorf* disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, kemudian lemak yang berada dipermukaan susu dibuang menggunakan spatula, sentrifus ulang dilakukan dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dicuci sebanyak 2 kali dengan 1 ml *enzymatic lysis buffer* (20 mM Tris·Cl, pH 8.02 mM sodium EDTA, 1.2% Triton® X-100), kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Pelet ditambahkan 180 µl *enzymatic lysis buffer* yang telah ditambahkan 5 µl *lysostaphin* (1,8 U/µl) dan *Lysozyme* dengan konsentrasi 20 mg/ml, kemudian diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 37°C selama 120 menit. Campuran tersebut ditambahkan buffer AL dan Proteinase K (14,8 mg/ml) 25µl, inkubasi *waterbath* 56°C 120 menit. Sebanyak 420 µl etanol absolut ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan ke dalam kolom *Qiamp*. Kolom selanjutnya disentrifus 6000 g selama satu menit, kemudian ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 µl bufer AW. Kolom *Qiamp* kemudian disentrifus 6000 g selama tiga menit, kemudian kolom ditempatkan di atas tabung *Eppendorf* dan DNA yang ada pada kolom dielusui dengan 200 µl buffer. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C.

Identifikasi Molekuler *Staphylococcus sp.* dan *S.aureus*

Identifikasi molekuler *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* dianalisis berdasarkan amplifikasi gen

23S rRNA yang ditentukan dengan menggunakan primer spesies spesifik dengan program PCR yang telah ditentukan berdasarkan referensi (tabel 1). Campuran untuk PCR sebanyak 25 µl terdiri atas 2 µl primer *forward* (10 pmol/µl), 2 µl primer *reverse* (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR mix (GoTaq® Green Master Mix, Promega), 6,5 µl ddH₂O dan 2 µl 20-40 ng *template* DNA. Campuran kemudian disentrifus beberapa detik, dan dimasukkan dalam *thermal cycler* dengan program siklus sesuai tabel 1. Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis dengan 2% agarose dan 0,5 µg/ml *ethidium bromide* kemudian divisualisasi dengan UV transluminator, dibandingkan dengan kontrol dan marker 1 Kb DNA *Ladder*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa keberadaan *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* didalam susu segar dapat dideteksi langsung menggunakan PCR dengan primer spesifik spesies. Ekstraksi DNA dari susu segar dilakukan dengan modifikasi pada tahapan awal preparasi ekstraksi dari metode ekstraksi Aziz (2013). Optimasi yang dilakukan sebelumnya diketahui dapat mendeteksi keberadaan *S. aureus* dalam susu segar yang kompatibel dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) No 01-3141-1998 yaitu batas limit *S. aureus* yang diijinkan dalam susu adalah 10² sel/ml (Aziz et al. 2013). Penggunaan PCR sebagai alat deteksi diketahui mempunyai spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi sehingga deteksi langsung keberadaan gen target dari genom bakteri tertentu dapat dilakukan. Deteksi dini kontaminasi bakteri patogen pada susu dapat langsung dilakukan dengan cara lebih cepat.

Pemilihan metode ekstraksi berbasis *spin coloumn* dilakukan selain telah teruji kualitas DNA yang terekstraksi namun juga praktis penggunaannya. Penggunaan *spin column* dalam tahapan ekstraksi DNA langsung dari susu segar memberikan hasil ekstraksi yang baik. Purifikasi DNA berbasis *column* yang menggunakan metode ekstraksi *solid phase* telah dikenal luas digunakan untuk mendapatkan DNA murni (Dash et al., 2020).

Hasil penelitian diketahui 37 (61%) sampel susu yang diuji positif *Staphylococcus sp.* dengan

primer Cremonesi *et al.* (2005) dan hanya 1 (1,6%) sampel positif mengandung *S. aureus* dengan primer Straub *et al.* (1999). Identifikasi molekuler *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus* dengan menggunakan target gen 23S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri secara sensitif dan spesifik termasuk pada Isolat *S. aureus* ATCC milik Balai Besar Veteriner Wates dan MRSA milik Bagian Mikrobiologi FK UGM digunakan sebagai kontrol positif memberikan hasil yang konsisten (gambar 1 dan 2). Gen 23S rRNA merupakan bagian penting pada proses sintesis protein. Urutan basa nukleotida pada 23S rRNA sangat identik pada hampir semua bakteri, sehingga dapat dieksploitasi guna identifikasi genus dan spesies. Gambar 1 menunjukkan bahwa sampel yang diuji PCR menggunakan primer referensi Cremonesi *et al.* (2005) terdeteksi bakteri *Staphylococcus sp.* dengan ukuran produk PCR 499 bp dan hanya 1 sampel susu positif *S. aureus* dengan ukuran sesuai referensi 1250 bp menggunakan primer Straub *et al.* (1999) (gambar 2, sumuran ke-4). Diketahui konsistensi ditunjukkan dari 1 sampel positif *S. aureus* primer Straub *et al.* (1999) juga positif terhadap primer Cremonesi *et al.* (2005) yang digunakan (Gambar 1 dan 2, sumuran ke-4).

Penelitian yang dilakukan oleh Harvey dan Gilmour (1988), Coimbra-e-Souza *et al.* (2019) diketahui spesies *Staphylococcus* yang umum ditemukan di susu kambing diantaranya *S. aureus*, *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, dan *S. xylosus* sehingga dipastikan 37 sampel susu yang positif PCR terhadap primer spesifik *Staphylococcus sp.* terdeteksi satu atau lebih dari berbagai spesies

Staphylococcus tersebut diatas. Studi molekuler yang dilakukan Windria *et al.* (2016) pada susu kambing PE yang diteliti dengan mengurutkan basa nukleotida 23S rRNA, teridentifikasi *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. pasteurii*, dan *S. xylosus*. Hal tersebut mengindikasikan ambing kambing PE dapat terinfeksi oleh berbagai spesies dari genus *Staphylococcus*.

Pada penelitian ini, meskipun hanya 1 sampel positif *S. aureus*, namun kontaminasi sampel susu oleh bakteri ini mempunyai potensi menimbulkan keracunan makanan karena *S. aureus* mampu memproduksi eksotoksin berupa sekresi protein toksin yang stabil terhadap pemanasan. Susu diketahui merupakan media yang baik untuk pertumbuhan *S. aureus* sehingga dapat menjadi sumber keracunan makanan. Kontaminasi bakteri ini terjadi akibat adanya *S. aureus* dalam susu segar atau selama pengolahan. Tindakan pasteurisasi dapat mengurangi jumlah *S. aureus* akan tetapi enterotoksin bersifat termostabil sehingga tidak mengurangi aktivitas biologisnya meskipun telah mengalami pemanasan (Boerema *et al.*, 2006; Todar, 2008). Coimbra-e-Souza *et al.* (2019) dan Contreras *et al.* (2007) mengemukakan bahwa bakteri yang paling patogen penyebab mastitis pada kambing adalah *S. aureus*, bakteri ini tidak hanya berbahaya bagi manusia karena potensinya namun juga menyebabkan infeksi pada ambing kambing penderita dan dapat menyebabkan gangren sehingga menyebabkan angka *culling* yang tinggi.

Identifikasi *Staphylococcus sp.* maupun *S. aureus* pada susu selama ini sebagian besar dilakukan dilaboratorium dengan cara isolasi dan identifikasi bakteri secara konvensional menggunakan media selektif dan uji biokemis,

Tabel 1. Primer oligonukleotida dengan program PCR untuk amplifikasi gen target 23S rRNA *Staphylococcus sp.* dan *S. aureus*.

Spesies	Sekuen primer	Program*	Amplikon	Referensi
<i>Staphylococcus sp.</i>	5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' 3' TCG CTC GCT CAC CTT AGA AT 5'	1	499 bp	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005
<i>S. aureus</i>	5' ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC 3' 3' AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC 5'	2	1250 bp	Straub <i>et al.</i> , 1999

Keterangan : *

1 : 30 kali 94°C-60 detik, 56°C-60 detik, 72°C-60 detik

2 : 30 kali 94°C-120 detik, 64°C-40 detik, 72°C-75 detik

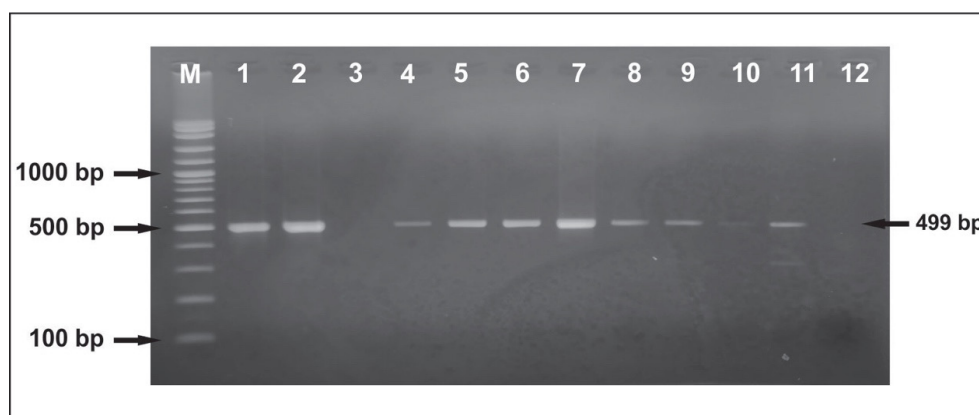
sehingga penentuan bakteri pengkontaminasi membutuhkan waktu lebih lebih dari 1 hari. Beberapa keterbatasan dari metode konvensional selain lamanya waktu yang dibutuhkan menurut Phuektes *et al.* (2001) dan Riffon *et al.* (2001) juga dipengaruhi oleh beberapa hal seperti terbatasnya dinamika alami dari infeksi pada sampel susu, sampel susu mungkin hanya mengandung jumlah bakteri yang sedikit dan kultur negatif mungkin karena adanya residu antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Metode PCR memberikan alternatif identifikasi bakteri secara lebih cepat. Dengan

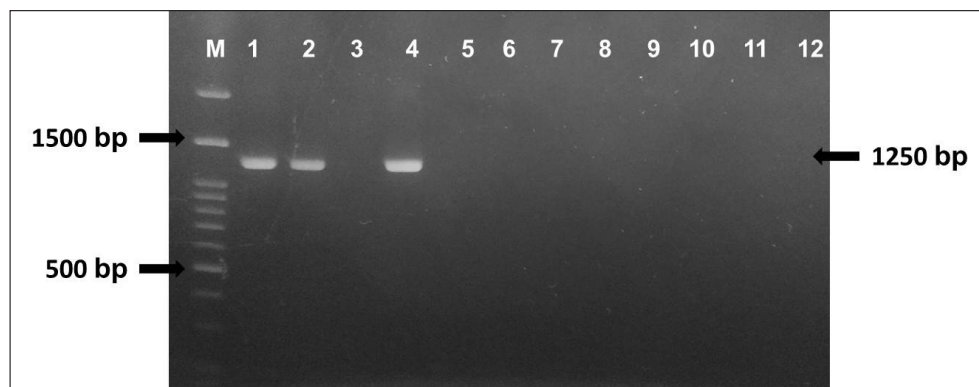
metode PCR, identifikasi bakteri patogen dapat dilakukan dalam hitungan kurang dari 24 jam bila dibandingkan dengan metode konvensional. Metode PCR dapat digunakan untuk deteksi bakteri patogen dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (Taponen *et al.*, 2009).

Kesimpulan

Tiga puluh tujuh sampel positif mengandung *Staphylococcus sp.* dan hanya 1 sampel positif untuk *S. aureus* dari 60 sampel susu segar yang diuji dengan teknik PCR.



Gambar 1. Gel elektroforesis hasil PCR 23S rRNA dari susu segar dengan primer Cremonesi *et al.* (2005) (Ket: M= marker, sumuran 1-2 kontrol positif ATCC dan MRSA, sumuran 3-11 sampel dan sumuran 12 kontrol negatif).



Gambar 2. Gel elektroforesis hasil PCR 23S rRNA dari susu segar dengan primer Straub *et al.* (1999) (Ket: M= marker, sumuran 1-2 kontrol positif ATCC dan MRSA, sumuran 3-11 sampel dan sumuran 12 kontrol negatif).

Daftar Pustaka

Achek, R., El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Ehricht, R., Hamdi, T. M.& Monecke, S. (2020). Diversity of staphylococci isolated from sheep mastitis in northern Algeria. *Journal of Dairy Science*. 103(1): 890-897.

Aziz, F. (2013). Determinasi Genetik *Staphylococcus aureus* Sapi Perah di Baturraden dan Pengembangan Deteksi Stafilokokal Mastitis Langsung dari Susu Segar dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Master Thesis*. Program Studi

- Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, UGM, Yogyakarta.
- Aziz, F. Salasia, S.I.O., Artdita, C.A. dan Lestari, F.B. (2013). Pengembangan Deteksi *Staphylococcus aureus* Langsung dari Susu Segar dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam Prosiding Seminar Nasional Teknologi Terapan, 01 Oktober 2013, Yogyakarta (ISBN 978-62-14066-2-5).
- 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*. *International Journal of Microbiology*. 107 (2): 192-201.
- Budisatria, I. G. S., Maharani, D., & Ibrahim, A. (2019). *Kambing Peranakan Etawah: Kepala Hitam atau Cokelat*. UGM PRESS.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., & Castiglioni, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and cellular probes*, 19(5): 299-305.
- Coimbra-e-Souza, V., Rossi, C. C., Jesus-de Freitas, L. J., Brito, M. A. V., Laport, M. S., & Giambiagi-deMarval, M. (2019). Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus spp.* isolated from goat milk. *Journal of dairy science*. 102(6): 5518-5524.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., & Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 68(1): 145-153.
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020). Isolation of DNA by Using Column-Based Extraction System. In *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing* (pp. 103-108). Humana, New York, NY.
- Fagundes, H., Barchesi, L., Filho, A. N., Ferreira, L. M. and Oliveira, C. A. F. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in Raw Milk Produced in Dairy Farms in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. (41): 376-380.
- Haenlein, G. F. (2002). Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small ruminant research*. 45(2): 163-178.
- Harvey, J. and Gilmour, A. (1988), Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology*. 7: 79–82.
- He, Y., Liu, H., Xian, M. and Li, Y. (2010). Detection and Identification of *Staphylococcus aureus* in Raw Milk By Hybridization to Oligonucleotide Microarray. *African Journal of Biotechnology*. 9(15): 2284-2289.
- Hayati, L. N., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Chusniati, S., Yunita, M. N., & Wibawati, P. A. (2019). Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* pada Susu Kambing Peranakan Etawah Penderita Mastitis Subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*. 2 (2): 76-82.
- Nielsen, C. (2009). Economic Impact Of Mastitis in Dairy Cow. *Doctoral Thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. and Andjones, G.M. (2010). *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. Virginia Cooperative Extension. Publication 404-229. www.ext.vt.edu. Diakses: 08 Mei 2019.
- Phuektes, P., Mansell, P. D, Browning, G. F. (2001). Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay For Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis. *J Dairy Sci*. 84 (5):1140–1148.
- Purnomo, A., Hartatik, Khusnan, Salasia, S. I. O. Dan Soegiyono. (2006). Isolasi dan Karakterisasi *Staphylococcus aureus* Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa. *Media Kedokteran Hewan*. 22 (3):142 – 147

- Riffon, R., Sayasith, K., Lhalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. and Lagace, J. (2001). Development of A Rapid and Sensitive Test For Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2584–2589.
- Salasia, S. I. O., Khusnan, Z., Lammler, C., Zschock, M. (2004). Comparative studies on pheno-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.
- Salasia, S. I. O., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D. and Prabawati, F. (2011). A Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans and food in Indonesia. *J. Vet. Sci.* 12(4): 353-361.
- 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 Products. *J. Food Prot.* 62 (10):1150–1156.
- Tan, A. and Hogg, G. (2008). *Staphylococcus aureus* and Food Borne Disease. *Microbiology Australia.* 29 (23): 155-156.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T. and Pyörälä, S. (2009). Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Identification of Bacteria in Milk Samples From Bovine Clinical Mastitis With No Growth in Conventional Culturing. *J. Dairy Sci.* 92 (6):2610–2617.
- Todar, K. (2008). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Disease; Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbook of bacteriology.net. Diakses : 08 Januari 2020.
- Windria, S., Widianingrum, D. C., & Salasia, S. I. O. (2016). Identification of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci Isolates from Mastitis Milk of Etawa Crossbred Goat. *Research Journal of Microbiology*, 11(1): 11.