

**Deteksi Gen Penyandi *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* Isolat *Staphylococcus aureus* Asal Susu Sapi dan Susu Kambing dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***

**The Detection of Encoding Gene of *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* *S. aureus* isolate from the Milk of Cows and Goats By *Polymerase Chain Reaction***

**Rony M. Kunda<sup>1</sup>, A.E.T.H. Wahyuni<sup>2</sup>, Rini Widayanti<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Alumnus Pascasarjana Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup>Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Email: ronykunda@gmail.com

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* is the main bacterium found in cow's and goat's milk. The bacteria can produce toxin called toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) that can infect humans and animals causing several serious diseases. The objective of this study was to detect the existence of encoding gene of TSST-1 *S. aureus* isolate from cow's and goat's milk. The research is initiated by re-identification stage of *S. aureus* conventionally continued by identification based on the molecular method of polymerase chain reaction (PCR). A number of 10 *S. aureus* isolates from cow's and goat's milk cultured in aerobics continued by Gram stain, catalase, coagulase, MSA, VJA and VP tests. The identification of *S. aureus* based on the molecular approach conducted by 16S rRNA gene amplification continued with amplification of TSST-1 encoding gene as the target gene. The PCR product of TSST-1 encoding gene then sequenced to ensure whether the DNA fragment amplified is the TSST-1 encoding gene or not. The result of the research indicates that re-identification of *S. aureus* conventionally generating positive reaction of *S. aureus* species. Molecular identification of 16S rRNA gene amplification gives a good result by producing DNA fragment of 745 bp size and meets the target gene. The detection result of encoding gene TSST-1 gives negative result marked by DNA fragment which the size does not match the target gene. The alignment result of sequence isolate SA.1 indicates that the sequence is not *tst* gene but the gene which coded glutamate synthetase belongs to *S. aureus*, whereas sequence of isolate KI.8 is 50S rRNA gene belongs to *S. saprophyticus*.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, TSST-1, polymerase chain reaction, cow's and goat's milk, 16S rRNA

## Abstrak

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang pada umumnya terdapat dalam air susu sapi dan kambing. Bakteri tersebut menghasilkan toksin (*toxic shock syndrome toxin-1* atau TSST-1) yang dapat menimbulkan berbagai macam penyakit pada hewan maupun manusia. Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi gen penyandi TSST-1 isolat *S. aureus* berasal dari susu sapi dan susu kambing. Penelitian ini diawali dengan tahap identifikasi ulang *S. aureus* secara konvensional dan dilanjutkan dengan identifikasi *S. aureus* berbasis molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Sepuluh isolat *S. aureus* berasal dari susu sapi dan kambing dikultur aerobik dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji katalase, koagulase, MSA, VJA and VP. Identifikasi *S. aureus* berbasis molekuler dilakukan melalui amplifikasi gen 16S rRNA, dilanjutkan amplifikasi gen penyandi TSST-1, kemudian disekuensing untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang teramplifikasi merupakan gen penyandi TSST-1 atau tidak. Penelitian ini memberikan hasil positif *S. aureus* pada uji reidentifikasi, selanjutnya dikonfirmasi identitas spesiesnya secara molekuler. Semua isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen 16S rRNA menghasilkan fragmen tunggal, serta berukuran 745 bp. Deteksi gen penyandi TSST-1 adalah negatif ditandai oleh adanya fragmen DNA yang ukurannya tidak sesuai dengan DNA target. Hasil *alignment* sekuen gen isolat SA.1 menunjukkan, bahwa sekuen tersebut tidak gen *tst*, tetapi merupakan gen yang mengkode *glutamate synthase* milik *S. aureus*. Sedangkan, sekuen isolat KI.8 adalah gen 50S rRNA milik *S. saprophyticus*.

**Kata kunci:** *Staphylococcus aureus*, TSST-1, *polymerase chain reaction*, susu sapi dan susu kambing, 16S rRNA

## Pendahuluan

Susu merupakan sekresi kelenjar *mammae* sapi atau hewan menyusui lainnya, yang mengandung berbagai macam komponen penting, antara lain: protein, lemak, vitamin, mineral, laktosa dan berbagai macam enzim, serta beberapa mikroba (Lampert, 1980). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri utama yang ditemukan dalam susu sapi dan susu kambing (Wahyuni, 2011a). Bakteri tersebut dapat menginfeksi hewan maupun manusia (Prescott and Langsing, 1999; Jawetz *et al.*, 2004). Pada manusia, *S. aureus* dapat menimbulkan berbagai macam penyakit serius, antara lain: infeksi kulit, endokarditis, pneumonia, *osteomyelitis*, *sepsis arthritis*, *encephalitis*, *meningitis*, *staphylococcal food poisoning* (SPF), *staphylococcal scalded-skin syndrome* (SSSS) serta *toxic shock syndrome* (TSS) (Tseng *et al.*, 2004).

Salah satu toksin yang dihasilkan oleh *S. aureus* adalah *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1), yang dapat menyebabkan kelainan pada berbagai macam organ. Kelainan tersebut ditandai demam, hipotensi, gangguan organ pencernaan, sel endothelia, dan otot polos pembuluh darah. Menurut Zschock *et al.* (2000); Purnomo *et al.* (2006), *S. aureus* yang terdapat dalam susu segar dapat menyebabkan *toxic shock syndrome* (TSS) pada manusia akibat keracunan susu.

Sampai saat ini, penelitian tentang TSST-1 telah banyak dilakukan di berbagai belahan dunia dengan berbagai isolat dan metode (Johnson *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1998; Zschock *et al.*, 2000). Di Indonesia, penelitian tentang TSST-1 belum pernah dilakukan, padahal mayoritas masyarakat Indonesia mengkonsumsi susu segar tanpa mengetahui ada tidaknya bakteri *S. aureus* yang memproduksi TSST-1. Mengingat bahwa penelitian tentang deteksi gen

penyandi TSST-1 isolat *S. aureus* asal susu dan susu kambing di Indonesia belum pernah dilaporkan, maka dilakukan penelitian ini. Pada penelitian ini, keberadaan gen *tst* yang merupakan gen penyandi TSST-1 akan dideteksi dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Selanjutnya hasil PCR akan disekuensing untuk memastikan kebenaran gen penyandi TSST-1 hasil PCR.

### Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2012 - Agustus 2012. Proses identifikasi ulang *S. aureus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM. Isolasi DNA dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM. Hasil PCR dikirim ke PT Genetika Science Jakarta untuk disekuensing.

Isolat *S. aureus* yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 10 isolat, terdiri dari lima isolat asal susu sapi dan lima isolat asal susu kambing Peranakan Ettawa (PE). Isolat *S. aureus* asal susu sapi diisolasi dari UP2KH FKH-UGM, sedangkan susu kambing PE diisolasi dari peternakan Sayegan, Sleman, Yogyakarta dari susu mastitis klinis dan subklinis.

Penelitian ini diawali dengan tahap identifikasi ulang *S. aureus* secara konvensional, meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, koagulase, *manitol salt agar* (MSA), *Vogel Jhonson agar* (VJA) dan uji *Vogas Proskauer* (VP). Identifikasi *S. aureus* berbasis molekuler dilakukan dengan amplifikasi gen 16S rRNA, dilanjutkan dengan amplifikasi gen penyandi TSST-1 sebagai gen target. Produk PCR gen penyandi TSST-1 kemudian disekuensing untuk

memastikan bahwa fragmen DNA yang teramplifikasi merupakan gen penyandi TSST-1 atau tidak.

Molekul DNA *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi dengan *genomic DNA mini kit (Blood/cultured cell)* (Geneaid) sesuai dengan prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Bakteri diinokulasi dalam media PAD pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Kemudian, 5-10 koloni bakteri disuspensikan ke dalam 200 µl bufer lisozim dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Sebanyak 200 µl bufer GB ditambahkan ke dalam sampel dan divorteks selama 5 detik. Proses selanjutnya, yaitu sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 24 jam. Sebanyak 1 µl RNase A (50 mg/ml) ditambahkan pada sampel, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit, ditambah 200 µl etanol absolut. Tahap berikut adalah menempatkan GD *column* ke dalam *collection tube* berukuran 2 ml dan sampel (termasuk presipitat) dipindahkan ke dalam GD *column*. Sampel kemudian disentrifus pada 14.000 rpm selama 2 menit. *Collection tube* dan cairan di bawahnya dibuang, setelah itu GD *column* dimasukkan ke dalam *collection tube* 2 ml yang baru, ditambahkan 400 µl bufer W1 dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* dan cairan yang di bawahnya dibuang, GD *column* dimasukkan ke dalam *collection tube* 2 ml yang baru dan ditambahkan 600 µl bufer *wash* dan selanjutnya disentrifus pada 14.000 rpm selama 1 menit. Larutan yang tersaring dalam *collection tube* dibuang, kemudian GD *column* disentrifus lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit untuk dikeringkan, larutan yang tersaring dalam *collection tube* dibuang.

Setelah selesai, GD *column* dipindahkan ke

dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml yang bersih, kemudian ditambahkan 150  $\mu$ l bufer *elution* ke dalam membran GD *column* dengan pengulangan sebanyak dua kali, dengan masing-masing pengulangan 75  $\mu$ l. Setiap pengulangan, *tube* disentrifus pada 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Larutan yang tersaring di bawah merupakan hasil isolasi DNA. Sampel hasil isolasi DNA disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ketebalan sampel DNA dilihat dengan cara elektroforesis. Hasil isolasi DNA sebanyak 3  $\mu$ l yang dicampur dengan *gliserin bromphenol blue* (GBB) ( $1^{\text{st}}$ base). Untuk elektroforesis digunakan gel agarose 1, 5% yang diwarnai dengan *bioatlas* 2  $\mu$ l. Gel agarose dibuat dan dielektroforesis dalam bufer TBE 1X. Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda=260$  nm).

Hasil isolasi DNA akan digunakan untuk cetakan pada proses amplifikasi dengan metode PCR. Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA ditentukan dengan menggunakan primer spesifik (Tabel 1). Campuran reaksi PCR adalah sebanyak 25  $\mu$ l terdiri dari 2  $\mu$ l primer *forward* dan *reverse* masing-masing dengan konsentrasi (10 pmol), 12,5  $\mu$ l KAPA *Taq DNA polymerase*, 1  $\mu$ l DNA total, dan ditambahkan ddH<sub>2</sub>O untuk memenuhi volume satu reaksi hingga mencapai 25  $\mu$ l.

Kondisi mesin PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA sebagai berikut: predenaturasi pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, denaturasi pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *annealing* pada suhu  $59^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik. Elongasi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit dan *post-elongation* pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

Amplifikasi gen penyandi TSST-1 ditentukan

dengan menggunakan dua pasang primer spesifik (Tabel 1). Campuran reaksi PCR adalah sebanyak 25  $\mu$ l terdiri dari 2  $\mu$ l primer *forward* dan *reverse* masing-masing dengan konsentrasi (10 pmol), 12,5  $\mu$ l KAPA *Taq DNA polymerase*, 1  $\mu$ l DNA total, dan ditambahkan ddH<sub>2</sub>O untuk memenuhi volume satu reaksi hingga mencapai 25  $\mu$ l.

Kondisi mesin PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen penyandi TSST-1 sebagai berikut: predenaturasi pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, denaturasi pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik, *annealing* untuk primer *tstA* pada suhu  $48^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik dan primer *tstB* pada suhu  $46^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik. Elongasi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik dan *postelongation* pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

Proses elektroforesis dengan gel agarose dilakukan untuk melihat hasil isolasi DNA dan PCR. Proses yang diawali dengan pembuatan gel konsentrasi 1,5%, mencukupi untuk gel agarose dengan 8 sumuran. Sampel hasil PCR sebanyak 3  $\mu$ l diambil dengan mikropipet lalu dicampurkan dengan *gliserin bromphenol blue* (GBB) sebanyak 2  $\mu$ l dan dimasukkan ke dalam sumuran agarose. Elektroforesis dilakukan dengan arus listrik 100 volt dan ditunggu hingga proses selesai  $\pm$  15 menit. Pita molekul DNA diamati dengan bantuan UV *transilluminator* ( $\lambda=260$  nm), sedangkan panjang DNA hasil amplifikasi dapat diketahui dengan penanda DNA yang berukuran 100 *basepair* (bp).

Sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Jakarta dengan menggunakan metode Sanger. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan primer *tstA* dan *tstB forward* dan *reverse* masing-masing dengan konsentrasi 10 pmol. Sampel SA.1 dilakukan 2 kali reaksi sekuensing menggunakan

primer *tstA* dan sampel KI.8 dilakukan 4 kali reaksi sekuensing menggunakan primer *tstB*.

Data sekuen DNA gen *tst* hasil sekuensing dibandingkan dengan sekuen gen *tst* yang ada di *GeneBank* secara *online* menggunakan program

*basic local alignment search tool nucleotide* (BLASTN). Perbandingan dilakukan menggunakan sekuen-sekuen yang paling mirip (*highly similar sequence*) maupun *somewhat similar sequence*.

Tabel 1. Primer oligonukleotida spesifik untuk amplifikasi gen 16S rRNA dan *tst*

Target	F/R	Urutan Basa	Tm (°C)	Produk PCR
16S rRNA	F	5' GAAGGCGACTTTCTGGTCTG 3'	64,1	745 bp
	R	5' TCGACGGCTAGCTCCTAAAA 3'	64,2	
Gen <i>tstA</i>	F	5' GTAAGCCCTTTGTTGCTTGC 3'	64,2	215 bp
	R	5' CTGATGCTGCCATCTGTGTT 3'	64,2	
Gen <i>tstB</i>	F	5' TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT 3'	63,8	179 bp
	R	5' TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT 3'	59,5	

Keterangan:

F\* = *forward.*, R\* = *reverse*

### Hasil dan Pembahasan

Reidentifikasi 10 isolat *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan karakter Gram positif, berbentuk kokus bergerombol seperti buah anggur, katalase positif, koagulase negatif dan positif, memfermentasi manitol pada media MSA, mampu mereduksi senyawa *tellurite* pada media VJA, serta pada uji VP menghasilkan reaksi positif, ditandai warna merah muda. Hasil reidentifikasi 10 isolat *S. aureus* asal susu dan susu kambing PE dirangkum pada Tabel 2.

Pada penelitian ini, 10 isolat *S. aureus* yang memberikan hasil positif pada uji reidentifikasi, selanjutnya dikonfirmasi identitas spesiesnya secara molekuler. Hasil yang ditemukan pada penelitian ini yaitu semua isolat memberikan hasil yang positif terhadap amplifikasi gen 16S rRNA (100%). Hasil elektroforesis menunjukkan, bahwa fragmen DNA 16S rRNA yang teramplifikasi sangat jelas, tebal, fragmen tunggal, serta berukuran 745 bp (Gambar 1).

Tabel 2. Hasil reidentifikasi isolat *S. aureus* asal susu dan susu kambing

No	Kode Isolat	Pengecatan Gram	Katalase	Koagulase	MSA	VJA	VP
1.	Sapi A.1	Gram +, kokus bergerombol	+	-	+	H	+
2.	Sapi B1.2	Gram +, kokus bergerombol	+	-	+	H	+
3.	Sapi D.2	Gram +, kokus bergerombol	+	-	+	H	+
4.	Sapi D.3	Gram +, kokus bergerombol	+	+	+	H	+
5.	Sapi A.2	Gram +, kokus bergerombol	+	+	+	H	+
6.	Kambing I.3	Gram +, kokus Bergerombol	+	+	+	H	+
7.	Kambing I.7	Gram +, kokus bergerombol	+	+	+	H	+
8.	Kambing I.8	Gram +, kokus Bergerombol	+	+	+	H	+
9.	Kambing I.16	Gram +, kokus bergerombol	+	+	+	H	+
10.	Kambing I.20	Gram +, kokus bergerombol	+	+	+	H	+

Keterangan:

Katalase (+) : Menghasilkan gelembung setelah dicampur dengan peroksida

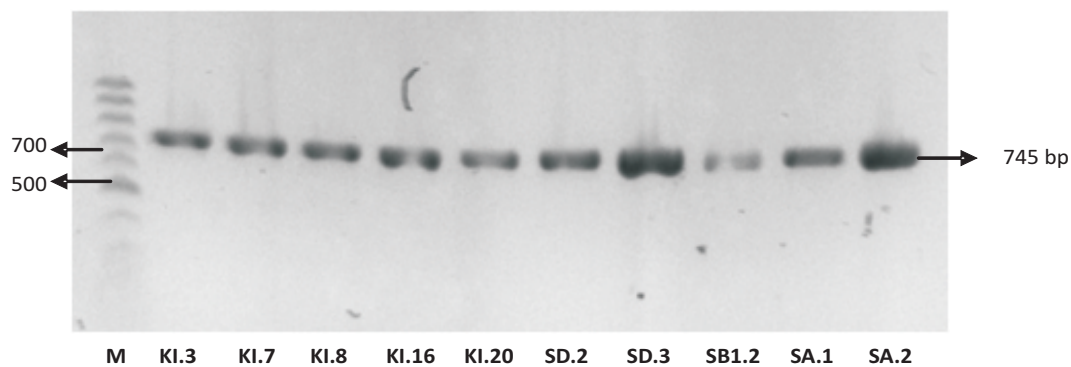
Koagulase Tabung (+) : Membentuk *clot* setelah didiamkan selama 4 jam dan 24 jam dalam *waterbath* 37°C

Koagulase Tabung (-) : Tidak membentuk *clot* setelah didiamkan selama 4 jam dan 24 jam dalam *waterbath* 37°C

MSA (+) : Memfermentasi manitol sehingga tumbuh koloni berwarna kuning

VJA (H) : Membentuk koloni hitam pada VJA

VP (+) : Berwarna merah muda setelah penambahan reagen  $\alpha$  naftol dan KOH yang menandakan *S. aureus* memproduksi acetoin.



Gambar 1. Elektroforesis hasil PCR gen 16S rRNA isolat *S. aureus* menggunakan agarose 1,5%

Keterangan : M= Marker 100 bp (Microzone)

K = sampel dari susu kambing

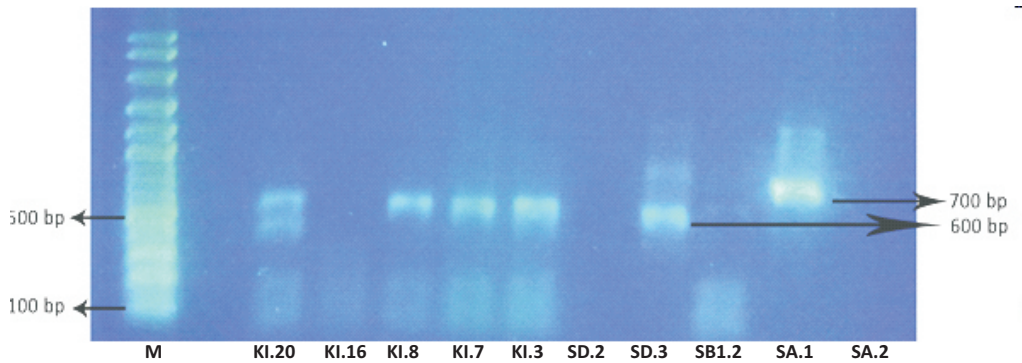
S = sampel dari susu



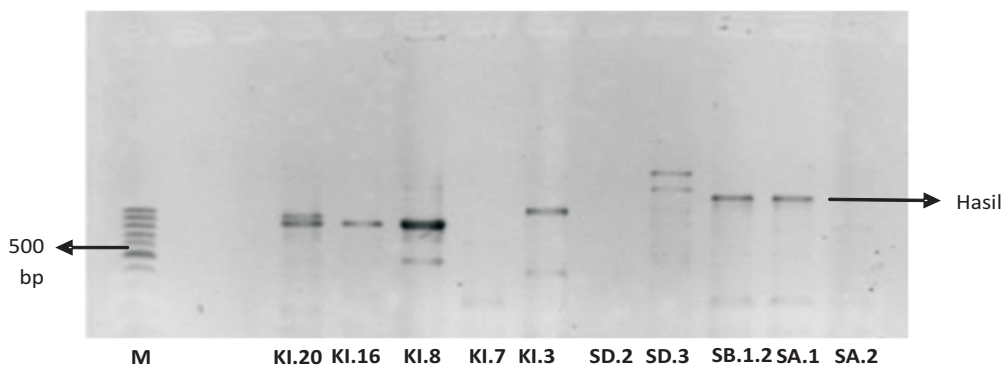
Sepuluh isolat yang telah dikonfirmasi identitasnya sebagai *S. aureus* dengan amplifikasi gen 16S rRNA kemudian diuji keberadaan gen *tst* menggunakan metode PCR. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, yaitu sebanyak 10 isolat memberikan hasil yang negatif terhadap amplifikasi gen *tst* (100%). Amplifikasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan dua pasang primer oligonukleotida, yaitu primer *tstA* dan *tstB*. Hasil yang negatif pada visualisasi *transilluminator* ditandai dengan munculnya fragmen DNA dengan panjang *basepair* (bp) yang tidak spesifik dan tidak

sesuai dengan panjang gen target (Gambar 2 dan 3).

Amplifikasi gen *tst* menggunakan primer *tstB* mengacu pada metode yang telah didemonstrasikan sebelumnya oleh Hayakawa *et al.* (2000). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebanyak 10 isolat memberikan hasil yang negatif terhadap amplifikasi gen *tst* (100%). Hasil visualisasi produk amplifikasi gen *tst* dengan menggunakan primer *tstB* menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 800-1000 bp berbeda dengan yang dikemukakan oleh referensi acuan, yang seharusnya 179 bp.



Gambar 2. Elektroforesis hasil PCR gen *tst* isolat *S. aureus* dengan primer *tstA* menggunakan agarose 1,5%  
 Keterangan: M = Marker 100 bp (Microzone)  
 K = sampel dari susu kambing  
 S = sampel dari susu



Gambar 3. Elektroforesis hasil PCR gen *tst* isolat *S. aureus* dengan primer *tstB* menggunakan agarose 1,5%  
 Keterangan: M = Marker 100 bp (Microzone)  
 K = sampel dari susu kambing  
 S = sampel dari susu

Optimasi PCR telah dilakukan untuk reaksi amplifikasi menggunakan kedua pasang primer selama berlangsungnya penelitian dengan variasi suhu *annealing*, pergantian PCR *mix* dari Kappa *readmix fast* ke Kappa *robust hotstart readymix* yang memiliki enzim *Taq polymerase* lebih banyak, dan konsentrasi primer. Sampai penelitian ini berakhir tidak ditemukan fragmen DNA dengan panjang sesuai yang tertera dalam *database GeneBank* dan pada referensi acuan. Fragmen DNA yang teramplifikasi pada penelitian ini menggunakan primer *tstA* yaitu berukuran 600-700 bp, sedangkan menggunakan primer *tstB* berukuran 800-1000 bp. Hasil amplifikasi ini berbeda dengan panjang target DNA yang semestinya, yaitu dengan primer *tstA* seharusnya berukuran 215 bp, dan primer *tstB* berukuran 179 bp.

Adanya fragmen DNA non spesifik pada elektroforesis hasil amplifikasi gen *tst*, mengindikasikan bahwa sangat mungkin kedua primer dapat menempel pada situs lain dalam genom *S. aureus* dan situs tersebut bukan situs gen *tst*. Hal ini sangat beralasan karena suhu *annealing* yang dipakai untuk amplifikasi gen *tst* berada di luar kisaran gradien suhu optimasi dari kedua pasang primer, yaitu 55-61°C. Suhu *annealing* untuk primer *tstA* 48°C selama 1 menit, dan primer *tstB* 46°C selama 1 menit mengikuti kondisi PCR pada referensi acuan.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa gen *tst* tidak teramplifikasi kemungkinan karena dari 10 isolat yang digunakan tidak satupun yang mempunyai gen *tst*. Hal ini didukung dengan kejadian hadirnya gen *tst* dengan persentase yang sangat kecil. Penelitian Johnson *et al.* (1991), menyimpulkan bahwa gen *tst* ditemukan

sekitar 14% dari 88 isolat *S. aureus*. Takeuchi *et al.* (1996), menyatakan bahwa dari 125 isolat *S. aureus* yang digunakan, hanya 10 isolat (8%) yang mempunyai gen *tst*. Sejalan dengan hal ini, Jawetz *et al.* (2004), menyatakan bahwa galur *S. aureus* yang menghasilkan gen *tst* hanya sekitar 20%. Kayser *et al.* (2005), menyatakan bahwa gen *tst* ditemukan hanya sekitar 1% dari semua isolat *S. aureus*. Wang *et al.* (2011), menyatakan bahwa gen *tst* ditemukan sekitar 70% dari galur *S. aureus* yang diisolasi dari penderita TSS. Kelemahan mendasar pada penelitian ini, yaitu tidak memiliki isolat kontrol yang berfungsi sebagai pembanding dengan isolat yang dipakai pada penelitian ini. Mengingat bahwa penelitian tentang deteksi gen *tst* sebagai penyandi TSST-1 di Indonesia belum pernah dilakukan, oleh sebab itu keberadaan isolat kontrol juga belum tersedia.

Sekuensing DNA dilakukan untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang teramplifikasi pada proses PCR, merupakan gen *tst* atau tidak. Sekuensing dilakukan hanya untuk dua isolat (SA.1 dan KI.8) mewakili sepuluh isolat yang digunakan pada penelitian ini. Hasil *alignment* sekuen gen isolat SA.1 menunjukkan, bahwa sekuen tersebut memiliki kesamaan (homologi) 88% dengan gen yang mengkode *glutamate synthase* pada isolat *S. aureus*. Hasil penyejajaran gen *tst* isolat KI.8 menunjukkan, bahwa sekuen tersebut mempunyai homologi dengan gen 50S rRNA milik *S. saprophyticus*, galur ATCC 15305, *Accession number* AP008934.1.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan, yaitu 10 isolat (100%) *S. aureus* dapat diisolasi dan diidentifikasi secara konvensional dan molekuler



dan gen *tst* tidak terdeteksi pada semua isolat *S. aureus* yang dipakai pada penelitian ini, meskipun sudah menggunakan dua pasang primer spesifik (*tstA* dan *tstB*). Perlu penelitian lebih lanjut dengan penambahan isolat sampel dan diharapkan juga digunakan isolat kontrol positif supaya lebih memantapkan proses amplifikasi gen *tst*.

#### Daftar Pustaka

- Hayakawa, Y., Akagi, M., Hayashi, M., Shimano, T., Komae, H., Funaki, O., Kaido, T., Funaki, O., Kaido, T. and Takeuchi, S. (2000) Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cow. *Vet Microbiol.* 72: 321-327.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelbergh, E.A. (2004) *Staphylococcus aureus*. 2<sup>th</sup> Edition. Appleton and Large. Medical Publication. California.
- Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E. Pollard, D. R and Rozee, K. R. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin Mic.* p: 426-430.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J and Zinkernagel, R.M. (2005) *Medical Microbiology*. 2<sup>th</sup> Edition. Thieme Stuttgart. New York, USA.
- Lampert, C.M. (1980) *Modern Dairy Product*. New York Publishing. Co. Inc., New York, USA. pp. 234-255.
- Prescott, H.K. and Langsing, M.P. (1999) *Microbiology*. 4<sup>th</sup> Edition. WBC. MC The Graw-Hill Companies, Inc. P. 771.
- Purnomo, A., Hartatik., Khusnan., Salasia, S. I. O. dan Soegiyono (2006) Isolasi dan karakterisasi *Staphylococcus aureus* asal susu kambing peranakan Ettawa. *Media Kedokteran Hewan*. Vol. 22, No. 3.
- Takeuchi, S., Ishiguro, K., Ikegami, M., Kaidoh, T. and Hayakawa, Y. (1996) Detection of toxic shock syndrome toxin-1 gene in *Staphylococcus aureus* bovine isolates and bulk milk by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 1133-1135.
- Tseng, C.W., Zhang, S. and Stewart, G.C. (2004) Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxins D gene expression. *J. Bacteriol.* 186: 1793-1801.
- Wahyuni, A.E.T.H. (2011) Bakteri patogenik yang diisolasi dari susu kambing peranakan Ettawa (PE) di Sayegan, Sleman, Yogyakarta. Prosiding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan III. Fakultas Peternakan. Universitas Padjajaran, Bandung.
- Wang, D., Chen, H., Li, H., Qi, Z.H., Ding, X. and Deng, L. (2011) Detection of *Staphylococcus aureus* carrying the gene for toxic shock syndrome toxin 1 by quantum-dot-probe complexes. *J. Fluoresc.* 21: 1525-1530.
- Zschock, M., Botzler, D., Blocher, S., Sommerhauser, J. and Hamann. H. P. (2000) Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Int. Dairy. J.* 10: 569-57.