

**USUL LAPORAN PENELITIAN LANJUT BIDANG ILMU  
KATEGORI TINGKAT LANJUT**

BIDANG ILMU



**DETEKSI GEN ~~PENYANDI~~ TOXIC SHOCK SYNDROME TOXIN-1  
(TSST~~1st~~-1)  
ISOLAT *Staphylococcus aureus*  
~~ISOLAT~~ ASAL SUSU SAPI PERAH DAN SUSU KAMBING DARI  
BOGOR**

Oleh:

Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si., M.Si

Drs. Budi Prasetyo, M.Si

[novi@ut.ac.id](mailto:novi@ut.ac.id)

Formatted: Font: (Default) Arial, Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Bold

Formatted: Font: (Default) Arial, Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Bold

Formatted: Font: (Default) Arial, Bold, Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: 14 pt, Indonesian

Formatted: Font: 14 pt, Indonesian

Formatted: Font: 14 pt, Indonesian

Formatted: Font: 14 pt, Indonesian

Formatted: Font: 14 pt, Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

**Commented [U1]:** Dimohon dimasukkan tambahan tim peneliti juga data identitasnya, dimasukkan pada lampiran personalia penelitian.

**Commented [U2]:**

**Commented [U3]:** Harus ditambah dengan anggota peneliti, maksimal 2 orang

Formatted: Font: Bold, No underline, Font color: Auto, Indonesian

Formatted: Font: Bold, Indonesian

Formatted: Font: Bold, Indonesian

Formatted: Font: Bold, Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

**LEMBAGA PUSAT PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU  
PENGETAHUAN ALAM  
2012**

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, 13 pt, Bold

Formatted: Font: (Default) Arial, 13 pt, Bold, Indonesian

Formatted: Centered

Formatted: Indonesian

**LEMBAR PENGESAHAN  
USULAN LAPORAN PENELITIAN LANJUT BIDANG ILMU  
UNIVERSITAS TERBUKA**

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

1. a. Judul Penelitian : ~~Toxic Shock Toxin (tst)~~ **DETEKSI GEN PENYANDI**  
~~OXIG Shock TOXIN (tst)~~

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

~~SYNDROME TOXIN-1 (TSST-1) Isolat~~  
~~Staphylococcus aureus ISOLAT Asal Susu~~  
~~Sapi Perah dan Susu~~  
~~KAMBING DAN SUSU KAMBING dari~~  
~~Bogoreger~~

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Not Bold, Indonesian

Formatted: Not Bold, Indonesian, Not All caps

Formatted: Font: Not Bold, Indonesian, Not All caps

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

b. Bidang Penelitian : Bidang Ilmu  
c. Klasifikasi Penelitian : Lanjut

2. Ketua Peneliti  
a. Nama Lengkap & Gelar : Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si  
b. NIP : 19701105 200212001  
c. Golongan Kepangkatan : Penata Muda Tk I/IIIB  
d. Jabatan Akademik Fakultas dan Unit Kerja : Lektor  
: FMIPA  
e. Program Studi : S-1 Biologi

3. Anggota Peneliti  
a. Jumlah Anggota : 1 orang  
b. Nama Anggota : Drs. Budi Prasetyo, M.Si  
c. Program Studi : S-1 Biologi

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

b. Lama Penelitian : 6 bulan  
5. Biaya Penelitian : Rp. 30.000.000  
6. Sumber Biaya : LPPM-UT

7. Pemanfaatan Hasil Penelitian : **Jurnal (UT dan nasional)**

Commented [U4]: Mungkin jurnal UT atau nasional dulu.

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

\_\_\_\_\_ Tangerang Selatan, 15  
Maret/Februari 2012  
Mengetahui

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial

Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

Dekan/Kepala UPBJJ

Ketua Peneliti,

Nuraini Soleiman  
NIP. 19540730198601 2 001

Elizabeth Novi Kusumaningrum  
NIP. 19701105 200212001

Menyetujui,  
Ketua LPPM

Menyetujui,  
Kepala Pusat Keilmuan

~~Agus Joko Purwanto~~~~Dewi Artati Padmo Putri~~  
Endang Nugraheni  
NIP. 19660508 199203 1 003

NIP. 19570422 198503 2 001

- Formatted: Font: (Default) Arial
- Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Arial, Indonesian

### A. Latar Belakang

~~Susu merupakan salah satu sumber makanan bergizi, tetapi mudah tercemar mikroorganisme bila penanganannya tidak memperhatikan aspek kebersihan yang sering menyebabkan keracunan (Balía et al. 2008 dalam Gustiani, 2009) di samping sumber dapat menurunkan mutu dan menyebabkan produk tersebut tidak aman jika dikonsumsi oleh manusia. Hal tersebut sering mengakibatkan terjadinya keracunan. Akibatnya susu mengalami~~

- Formatted: Centered
- Formatted: Indonesian
- Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian
- Formatted: Font: 12 pt, Indonesian
- Formatted: Default, Right: 0"
- Formatted: Font: 12 pt
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Kasus keracunan setelah minum susu di Indonesia sering dilaporkan, baik melalui media cetak maupun ataupun media elektronik. Pada bulan September 2004, telah terjadi keracunan setelah minum susu pada 72 siswa Sekolah Dasar (SD) di Tulung Agung Jawa Timur, 300 siswa SD di Bandung, dan 73 karyawan Carefour di Surabaya, (Suwito, 2010). Kasus serupa juga terjadi pada tanggal 2 Juni 2009 pada terhadap 10 siswa SD di Cipayung Jakarta Timur dan 293 siswa SD di Kecamatan Sindangkartá Kabupaten Bandung. Gejala keracunan yang timbul yaitu para siswa mengalami mual-mual setelah mengonsumsi susu dalam kemasan (Suwito, 2010). Menurut Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) menyatakan bahwa kasus tersebut disebabkan oleh *E. coli* dan *S. aureus* (Suwito, 2010).

- Formatted: Font: (Default) Times New Roman
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Salah satu toksin yang paling banyak menyebabkan keracunan pada susu yaitu enterotoksin (Jorgensen et al., 2005; Suwito, 2010). Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini terjadi dengan dua cara yaitu menginfeksi manusia melalui makanan (*food infection*) dan meracuni melalui makanan (*food poisoning*). Apabila jika strain enterotoksigenik *S. aureus* terdapat dalam makanan dan tumbuh tidak terkontrol, dapat menyebabkan *food poisoning outbreak* (Simon dan Sanjeev, 2007). Menurut Dosis infeksi dari satu unit dosis toksin

- Formatted: Font: (Default) Times New Roman
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian
- Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

kurang dari 1.0 µg pada makanan yang terkontaminasi, dapat menimbulkan gejala intoksikasi sebesar 1.0 µg. jumlah bakteri pada level ini adalah 1.0x10<sup>5</sup> CFU/g atau CFU/ml.

~~Sejalan dengan hal tersebut, penelitian yang dilakukan oleh~~ Yarwood *et al.* (2002), menunjukkan bahwa selain toksin enterotoksin, ditemukan juga TSST-1. (*Toxic shock syndrome toxin-1*) yang ~~diperkirakan diduga~~ terlibat secara bersama dengan enterotoksin dalam ~~banyak kasus-kasus~~ keracunan makanan. ~~Mengingat bahwa p~~Penyakit keracunan makanan yang disebabkan oleh *S. aureus* merupakan penyakit multi faktorial yang melibatkan aktivitas dari banyak gen. Keterlibatan dari banyak gen tersebut, ~~berperan~~ dalam mekanisme sintesis sejumlah protein tertentu untuk melawan mekanisme pertahanan tubuh sel hospesnya (*host defenses*). Menurut Yarwood *et al.* (2002), TSST 1 banyak terlibat secara menjelaskan bahwa TSST-1 yang dihasilkan oleh *S. aureus* juga merupakan penyebab utama keracunan makanan. Hal tersebut karena banyak terdapat kemiripan aktivitas biologi antara TSST-1 dengan *staphylococcal* enterotoksin.

Berdasarkan kerangka pemikiran tersebut di atas maka perlu dilakukan deteksi gen penyandi TSST-1 yang turut bertanggungjawab dalam menentukan arah patogenitas. ~~Sebagai penyebab terjadinya keracunan susu sehingga mengakibatkan terjadinya, Toxic shock syndrome, aureus isolat susu sapi perah dan susu kambing.~~ Hal ini tersebut berperan dalam penanganan kasus keracunan susu yang umumnya diakibatkan oleh *S. aureus*.

## B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan di atas, maka dibuat rumusan masalah yang perlu diteliti adalah apakah susu sapi dan susu kambing berasal dari Bogor dengan metode PCR dapat terdeteksi mengandung gen penyandi *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) yang menentukan arah patogenitas *Staphylococcus aureus* yang dapat mengakibatkan penyakit TSST.

## C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen penyandi *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) *S. aureus* isolat susu sapi perah dan susu kambing dengan menggunakan gen 23S rRNA sebagai langkah awal dalam penanganan beberapa kasus keracunan susu.

## D. Manfaat Penelitian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U5]: Diletakkan di tinjauan pustaka.

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U6]: Pernyataan mengenai permasalahan belum muncul, pernyataan itu diletakkan sebelum paragraph ini (perlu nya penelitian dilakukan). Pernyataan permasalahan berkisar pada kesulitan untuk mengetahui apakah susu yang akan dikonsumsi masyarakat di daerah/wilayah tertentu mengandung racun/toksin khususnya TSST 1?, sedangkan cara deteksi yang akurat sementara ini dengan menemukan gen penyandi toksin TSST1, sehingga perlu penelitian untukantisipasi kasus keracunan susu di daerah tertentu.

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U7]: Apakah permasalahannya adalah untuk menguji apakah metode PCR cocok untuk mendeteksi TSST1? Karena kalimat pada perumusan masalah menanyakan seolah-olah metode PCR belum pasti dapat mendeteksi gen penyandi TSST1. ATAU permasalahannya kesulitan untuk memastikan susu dari daerah tertentu apakah mengandung TSST1? sehingga perlu dideteksi yaitu menggunakan metode PCR.

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U8]: di daerah mana?

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Diharapkan dengan dapat dideteksinya gen penyandi TSST-1 ada relevansi dalam penanganan beberapa kasus keracunan makanan terutama keracunan susu yang diakibatkan oleh strain *S. aureus*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### Karakteristik

*Staphylococcus aureus* merupakan anggota dari Micrococcaceae, termasuk Gram positif kokus, memiliki bentuk bulat (*coccus*) dengan diameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , bergerombol seperti buah anggur, non motil, tidak berspora, bersifat anaerob fakultatif, memproduksi koagulase, mampu memfermentasi glukosa dengan *mannitol*, tahan terhadap lisozim dan dapat dibedakan dari spesies staphylococcal lainnya atas dasar pigmentasi emas koloni pada *nutrient agar* (Lowey *et al.*, 1998). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk bulat (*coccus*), berdiameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , bergerombol seperti buah anggur, non motil, tidak berspora, bersifat anaerob fakultatif, menghasilkan koagulase, membentuk pigmen kuning keemasan pada *nutrient agar* serta memfermentasi glukosa dengan *mannitol*. *Staphylococcus aureus* tahan terhadap lisozim, suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 35-37°C, dengan suhu minimum 6,7°C, dan suhu maksimum 45,5°C. Bakteri tersebut dapat tumbuh pada pH optimum sekitar 7,0 - 7,5. Todar, (2005); Carter and Wise, (2004), menyatakan bahwa *S. aureus* mempunyai memiliki karakteristik khusus ciri yang khas antara lain adanya diantaranya memiliki sifat hemolitik pada media agar darah, oksidase negatif, tumbuh pada suhu 15-45°C dalam NaCl dengan konsentrasi hingga 15%.

Commented [U9]:

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Commented [U10]: Langsung saja dijelaskan bahwa dengan

Formatted

Formatted

Commented [U11]: Materi disini sebaiknya diuraikan dalam

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

~~S. aureus banyak menyebabkan variasi infeksi pada manusia maupun infeksi yang meningitis, pneumonia, osteomielitis, staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS), toxic shock syndrome (TSS), serta keracunan pangan (Sugiyono, 2008). Salah satu faktor virulensi yang dihasilkan diproduksi oleh galur S. aureus yang biasanya menyebabkan terjadinya adalah enterotoksin. Toksin tersebut yang paling banyak dikaitdugakan menyebabkan disease di berbagai belahan dunia tempat Staphylococcal enterotoksin (SE), mempunyai berat molekul kira-kira 28 kDa serta dan mampu dapat mensekresi protein. Protein yang disekresikan resisten terhadap digesti enzim pencernaan yaitu trypsin, chymotrypsin, pepsin, rennin, dan papain. Selain itu, enterotoksin juga tahan terhadap pemanasan selama 30 menit (Jawets et al., 19982).~~

~~Staphylococcal enterotoksin Syang telah diketahui sampai saat ini sampai saat ini telah dilaporkan terdapat sembilan belas jenis staphylocoecal enterotoksin yaitu staphylococcal enterotoksin A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SEJ), K (SEK), L (SEL), M (SEM), N (SEN), O (SEO), P (SEP), Q (SEQ), R (SER), T (SET) dan U (SEU). (Williams et al., 2000; Yarwood et al., 2002; Letertre et al., 2003;; Sugiyono, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Yarwood et al. (2002), menyatakan bahwa Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) pernah disebut sebagai enterotoksin F (SEF). Hal tersebut karena TSST-1 banyak terlibat bersama dalam aktivitas biologi dengan staphylococcal enterotoksin. Namun ketika dikarakterisasi dilakukan penelitian lebih lanjut, ternyata semua staphylococcal enterotoksin akan menimbulkan reaksi emetik pada hospesnya dan tetapi reaksi ini yang tidak dimiliki oleh TSST-1. (Yarwood et al. 2002).~~

~~Beberapa penelitian membuktikan bahwa sifat farmakologi dan biokimia antara enterotoksin, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) serta pyrogenic toxin yang dihasilkan oleh Streptococcus pyrogenes mempunyai banyak kemiripan (Yarwood et al., 2002). Hal tersebut terlihat dari efek yang terjadi pada hewan uji dan kesamaan struktur tiga dimensi antara TSST-1, SEA, SEB, SEC, dan SED. Berdasarkan kesamaan tersebut, maka enterotoksin, TSST-1 dan eksotoksin streptococcus pyrogenic dikelompokkan sebagai pyrogenic toxin superantigen (PTSAgs). Namun dari kelompok pyrogenic toxin superantigen (PTSAgs) hanya enterotoksin yang menyebabkan reaksi emetik. Hal tersebut tidak terjadi pada TSST-1 dan Streptococcus pyrogenic (Yarwood et al., 2002).~~

#### ~~G-B. Informasi Gen Penyandi TSST-1~~

~~TSST-1 merupakan suatu protein dengan berat molekul 22 kDa dan poin isoelektrik (pI) 7,2. Protein tersebut, disandikan oleh gen tst dan dihasilkan oleh S. aureus yang dapat~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Indent: Left: 0", Hanging: 0.25"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

menyebabkan penyakit multi organ. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh TSST-1 yaitu *toxic shock syndrome* (TSS). Pada manusia, diawali dengan gejala klinis berupa demam, hipotensi, dan gangguan pada organ sedangkan dalam kasus yang serius dapat menyebabkan *shock* pada penderita (Bergdoll *et al.*, 1981; Bergdoll and Schlievert, 1984; Crass and Bergdoll, 1986). Dalam beberapa kasus, TSST-1 biasanya berhubungan dengan kondisi menstruasi pada wanita yang dapat menimbulkan berbagai macam reaksi imunologik (Bergdoll *et al.*, 1981; Bergdoll and Schlievert, 1984). Efek imunologik yang ditimbulkan oleh TSST-1 adalah induksi ekspresi reseptor interleukin 2 (IL-2), sintesis interleukin, proliferasi limfosit T dan stimulasi sintesis interleukin 1 (IL-1) oleh monosit manusia (Gampfer *et al.*, 2002). Tempat utama perlekatan TSST-1 pada sel mononuklear manusia dapat dikenali dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II (Joklik *et al.*, 1992; Gampfer *et al.*, 2002).

Penelitian mengenai produksi TSST-1 oleh *S. aureus* telah dilakukan oleh Takeuchi *et al.* (1996), penelitian tersebut bertujuan mendeteksi keberadaan TSST-1 dari isolat susu sapi perah yang menderita mastitis klinis dan subklinis termasuk berat molekul dan poin isoelektriknya (pI). Sebanyak 272 isolat *S. aureus* diteliti dan hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa dari 43 isolat susu sapi yang positif menderita mastitis klinis terdapat 25 (58,1%) yang menghasilkan TSST-1, dari 103 isolat susu sapi yang positif mastitis subklinis terdapat 79 (76,7%) yang menghasilkan TSST-1 dan dari 126 isolat lapangan ditemukan 95 (75,4%) yang menghasilkan TSST-1.

Sejalan dengan hal tersebut, sampai saat ini telah banyak penelitian yang berhasil mengamplifikasi gen *tst* sebagai salah satu *region* yang bertanggungjawab dalam menentukan virulensi *S. aureus*. Penelitian tersebut dengan menggunakan metode PCR. Amplifikasi gen *tst* dilakukan dengan primer spesifik yang menempel pada region dari gen *tst*. Penelitian yang dilakukan oleh Hayakawa *et al.* (2000), yang melihat korelasi antara mastitis pada sapi, antibodi TSST-1 dengan gen penyandi TSST-1 (*tst gene*) dari *S. aureus* pada susu. Pada penelitian ini, formulasi primer yang digunakan adalah

- 1-: 5'-TTCCTATTTGTAAAAGTGCAGACCCACT-3' dan primer
  - 2-: 5'-TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT-3',
- dan panjang fragmen DNA yang diamplifikasi 179 bp.

Amplifikasi gen penyandi TSST-1 dari susu sapi (*bovine*) dan susu kambing (*ovine*) berhasil diteliti oleh Lee *et al.* (1992), dengan menggunakan primer spesifik. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *TSST-1/tst* dari susu sapi dengan formulasi sebagai berikut: primer 1-: 5'-CTCTCTATCTCCTCA-3' dan primer 2-: 5'-GTTAGTGAGGATTAG-

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian



3', selanjutnya primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen ~~*tst* TSST-1~~ dari susu formulasi sebagai berikut: primer 1-: 5'-GGACGTTTCTCAGCGT-3' dan primer 2-: 5'-AACGGACTCCCTTTA-3'.

~~Purnomo et al. (2006), menyatakan bahwa *Staphylococcus aureus* yang terdapat dalam susu segar dan produk pangan dapat menyebabkan toxic shock syndrome (TSS) sebagai akibat dari keracunan pangan. Selanjutnya Bergdoll et al. (1981); Bergdoll and Schlievert, (1984); Crass and Bergdoll, (1986), menjelaskan bahwa toxic shock syndrome yang ditimbulkan pada manusia akibat mengonsumsi susu segar yang terkontaminasi TSST-1 akan ditandai dengan timbulnya gejala berupa demam, hipotensi, timbulnya peradangan pada organ pencernaan, serta dalam kasus yang parah, TSST-1 dapat menimbulkan situasi shock pada penderita. Penelitian yang dilakukan oleh Jones et al. (1986); Kenny et al. (1993); Matsunaga et al. (1993); Takeuchi et al. (1998), menjelaskan bahwa TSST-1 diproduksi secara bersamaan dengan *Staphylococcal enterotoksin A* (SEA) dan *Staphylococcal enterotoksin C* (SEC) dari isolat sapi yang menderita mastitis. Dalam beberapa kasus, *Staphylococcal enterotoksin A* (SEA) dan C (SEC) sering dikaitkan dengan penyakit bawaan makanan (*foodborne disease*). Diperkirakan bahwa TSST-1 juga turut terlibat dalam kasus keracunan makanan, namun mekanisme yang terjadi di dalam sel belum secara jelas diketahui.~~

Penelitian tentang gen penyandi faktor virulensi merupakan tahapan penting dalam kajian tentang arah patogenesis *S. aureus*. Kemungkinan gen penyandi faktor virulensi akan sangat bermanfaat dalam penentuan arah terapi yang diakibatkan oleh infeksi *S. aureus* (Moore and Lindsay, 2001).



## A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium terpadu Seameo Biotrop, Bogor selama 6 bulan dari bulan Mei sampai dengan bulan Oktober 2012.

Bahan: - Isolat bakteri *Staphylococcus aureus*

- Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari susu sapi perah dan susu kambing dalam *glycerol* — berasal dari Bogor
- Penanda DNA dan Primer
- Media THB, media PAD, media plat agar darah, dan *mannitol salt agar* (MSA)
- Bahan kimia untuk pewarnaan Gram,
- Bahan kimia uji katalase, uji koagulase dan bahan kimia untuk preparasi DNA

Alat: - Sentrifus

- Vortex
- Peralatan gelas
- Tabung *eppendorf*
- *Qiamp tissue kit*
- Mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400

## D-C. Prosedur kerja

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium, dengan tahapan sebagai berikut:

Reidentifikasi bakteri, preparasi DNA, amplifikasi gen 16SrRNA, amplifikasi gen penyandi TSST-1, sekuensing dan analisis data.

### 1. Reidentifikasi Bakteri

Isolat yang berasal dari susu sapi perah dan susu kambing yang diawetkan dalam *glycerol*. Tahap berikutnya yaitu dilakukan *screening* dan *reidentifikasi* dengan cara ditanam

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Indent: Left: 0", First line: 0"

Formatted: Indent: First line: 0.38", Space After: 0 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Commented [U12]: Belum kelihatan asal daerah darimana susu yang akan diuji diambil. Sampling susu kambing dan susu sapi berasal dari peternak daerah mana?. Harus ditentukan daerahnya.

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U13]: Tahapannya akan lebih jelas kalau dibuat nomor urutnya, misal: 1. Reidentifikasi bakteri, 2. preparasi DNA, dst.

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

dalam tabung reaksi yang telah berisi media THB diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang tumbuh dalam media THB kemudian ditanam lagi pada media PAD. Kemudian dilakukan tahap *screening* dengan cara dikultur sehingga diperoleh koloni yang seragam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan setelah media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Todar, 2005). Langkah selanjutnya dengan pewarnaan Gram, uji katalase, uji koagulase, serta kemampuan bakteri untuk memfermentasi *mannitol salt agar* (MSA).

## 2. Preparasi DNA

Molekul *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi ~~dengan~~ menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai dengan prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Bakteri ditanam dalam media plat agar darah selama 18-24 jam, suhu 37°C. Kemudian, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam buffer TE 180 µl (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8, setelah itu, tambahkan 5 µl *liso*~~zim~~*staphin* (1,8 U/µl). setelah itu, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, tambahkan 25 µl proteinase K (14,8 mg/ml) dan 200 µl buffer AL (yang berisi reagen AL1 dan AL2). Suspensi bakteri diinkubasi selama dua jam pada suhu 56°C, kemudian dilakukan *vortex* supaya homogen. Suspensi dipanaskan pada suhu 95°C dalam waktu 10 menit, dan kemudian didinginkan pada suhu 4°C dalam waktu 10 menit, kemudian suspensi disentrifus 6000 g selama 15 menit. Sebanyak 420 µl etanol ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan menggunakan 500 µl buffer AW. Kolom *Qiamp* kemudian disentrifus 6000 g dalam waktu tiga menit, setelah itu tempatkan kolom di atas tabung *ependorf* dan DNA yang ada pada kolom dielusasi dengan 200 µl buffer AE. Hasil eluat dari sampel DNA ~~akan~~ disimpan pada suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2004a; Salasia *et al.*, 2008).

## 3. Desain Primer

Desain primer oligonukleotida spesifik untuk gen ~~23~~<sup>16</sup>SrRNA, dan gen penyandi TSST-1 dilakukan berdasarkan database dari *genbank* dengan menggunakan program Clustal W. pasangan primer dipilih pada daerah yang konserv. Selanjutnya primer oligonukleotida dianalisis dengan menggunakan *software Design Oligoprimers*. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi gen 16SrRNA dan gen penyandi TSST-1 adalah sebagai berikut:

TARGET	R/F	URUTAN BASA	JUMLAH BASA
<u>23S rRNA</u>	R	GAAGGCGACTTCTGGTCTG	20

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: None, Space Before: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines, Don't keep with next, Don't keep lines together

Formatted: Centered, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Centered, Line spacing: 1.5 lines

16S rRNA	F	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	20
tst gene	R	TCGACGGCTAGCTCCTAAAA	20
	F	CCCCTGTTCCCTTATCATCT GTGGATCCGTCATTTCATTGT	20

#### 4. Amplifikasi gen 2316S rRNA dengan PCR (Coen, 2001)

Amplifikasi gen 2323S rRNA dari *S. aureus* dengan PCR pada penelitian ini akan menggunakan mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400 (Parkin Elmer). Proses amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 50-60°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72°C. DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta buffernya. Produk hasil-PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarose 1,5% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam peranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 300$  nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

#### 5. Amplifikasi gen (*tst*) penyandi *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1)

Amplifikasi gen penyandi TSST-1 dari *S. aureus* dengan PCR pada penelitian ini akan menggunakan mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400 (Parkin Elmer). Proses amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 50-60°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72°C. DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polymerase* beserta buffernya. Produk hasil-PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarose 1,5% dengan

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

menggunakan buffer 1xTBE dalam peranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 300$  nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

## 6. Sekuensing DNA (Nelson, dkk, 2001)

Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan ~~dengan~~ menggunakan *GFX Column purification kit* (Amersham, USA), selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan ~~untuk~~ reaksi sekuensing DNA. Kondisi untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selanjutnya diikuti dengan  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik,  $50-60^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik,  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada  $72^{\circ}\text{C}$ .

Produk reaksi sekuensing dipurifikasi menggunakan kolom autoseq G-50, kemudian DNA dikonsentrasikan dengan penambahan alkohol absolut yang dilanjutkan dengan pencucian menggunakan alkohol 70%. Setelah kering, ditambahkan ke dalamnya 6  $\mu\text{l}$  *stop solution*. Larutan diinkubasikan pada  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dan kemudian dimasukkan ke dalam es. Sekuensing DNA ~~dilakukan~~ menggunakan alat sekuensing otomatis *ALFexpres II* (Amersham pharmacia biotech), pada kondisi 1500 V, arus listrik 60mA, daya 25 W, suhu  $55^{\circ}\text{C}$ , selama 70~~0~~ menit.

## 7. Analisis Data

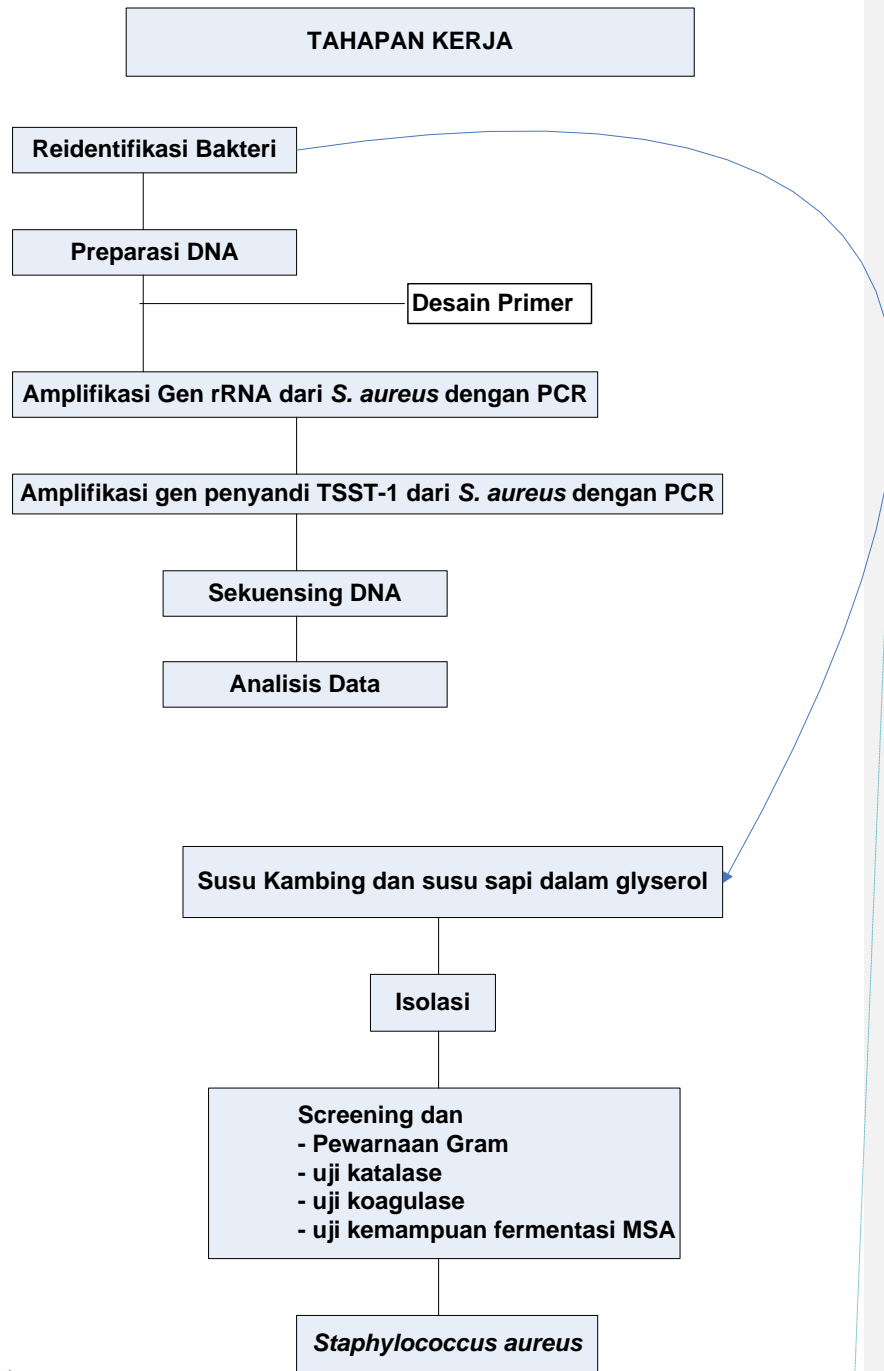
Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Commented [U14]: Sumber rujukan metode belum ada

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian



Field Code Changed

Formatted: Indonesian

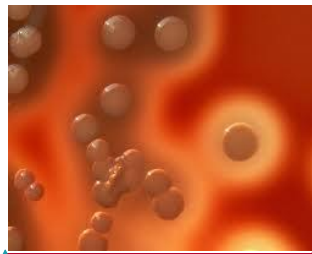
## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Reidentifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil isolasi bakteri yang berasal dari sampel susu sapi diperoleh 1 isolat dan dari susu kambing diperoleh 2 isolat. Identifikasi *S. aureus* dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis di samping itu juga dilakukan pengamatan terhadap morfologi koloninya yang berupa bentuk dan pewarnaan Gram. Serangkaian uji identifikasi dilakukan pada *S. aureus* meliputi uji katalase, uji koagulase, uji fermentasi manitol, uji Vogel Jonson Agar, dan uji Voges-Proskauer. Berikut hasil pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan Gram *S. aureus*.

#### 1. Bentuk Koloni

Hasil pengamatan karakteristik isolat *S. aureus* pada media Plate Agar Darah (PAD) menunjukkan bahwa koloni mempunyai bentuk bulat besar, bulat kecil, dan beberapa berbentuk ireguler. Pada media PAD tersebut koloni tampak berwarna putih dan kuning dengan zona bening hemolisis. Zona hemolisis terbentuk karena adanya toksin hemolisin yang diproduksi oleh *S. aureus*. Toksin tersebut mampu melisis sel darah merah manusia dan mamalia. Gambar koloni *S. aureus* pada PAD (Gambar 1).



Gambar 1. Isolat *Staphylococcus aureus* pada media PAD

#### 2. Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa 1 isolat dari susu sapi dan 2 isolat dari susu kambing yang diduga *S. aureus*, secara morfologi ternyata benar termasuk Gram positif karena sel bakterinya berwarna ungu (Gambar 2). Menurut Pelczar (1981), pada proses pewarnaan Gram, bakteri Gram positif tetap mempertahankan pewarna kristal violet dan lugol setelah dibilas dengan alkohol 95% sebagai decolorizer. Hal tersebut berkaitan dengan struktur dinding sel yang memiliki fungsi sebagai pelindung protoplas dari kerusakan mekanik dan pecah akibat tekanan osmotik. Ditegaskan pula bahwa, pada dinding sel bakteri

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indent: Left: 0", Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted

Formatted

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted

Gram positif, terdapat satu membran tebal terbuat dari peptidoglikan yang akan membentuk persenyawaan kompleks kristal violet-yodium ribonukleat yang tidak larut dalam larutan pemucat (Lay, 1994). Hal lain yang mendukung bahwa isolat tersebut *S. aureus* yakni bentuk koloni bulat dan berkelompok seperti buah anggur.

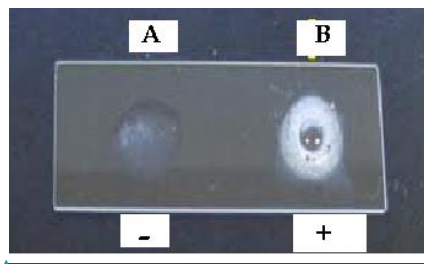


Gambar 2. Bakteri *Staphylococcus aureus* Gram Positif

Adapun hasil pengamatan makroskopis bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan sebagai berikut;

1. Uji Katalase

Katalase merupakan salah satu enzim yang digunakan mikroorganisme untuk menguraikan hidrogen peroksida. Pada proses penguraian tersebut dihasilkan gas atau gelembung oksigen. Untuk mengetahui ada tidaknya katalase maka perlu dilakukan uji dengan larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada koloni terpisah.



Gambar 3. Hasil uji katalase *S. aureus*

Keterangan :

- A. Negatif, tidak timbul buih/gelembung (bukan *S. aureus*)
- B. Positif, terdapat buih/gelembung (*S. aureus*)

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt  
 Formatted: Line spacing: 1.5 lines  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian  
 Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt  
 Formatted: Line spacing: 1.5 lines  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Right: 0"  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Justified, Right: 0", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Right: 0", Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman  
 Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian  
 Formatted: Justified, Indent: Left: 0.5", Line spacing: 1.5 lines

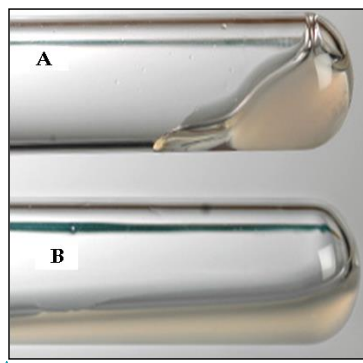


Karakteristik terbentuknya gelembung udara di sekitar koloni bakteri *S. aureus* menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat katalase-positif (Gambar 3B). Menurut Todar (2005), uji katalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, bahkan Carter dan Wise (2004) mengungkapkan bahwa katalase tidak dihasilkan oleh genus *Streptococcus* tetapi hanya dihasilkan oleh genus *Staphylococcus*.

## 2. Uji Koagulase

*Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim koagulase yang mampu menggumpalkan plasma. Terdapat dua macam enzim koagulase yaitu koagulase yang terikat dengan sel disebut *bound coagulase/clumping factor* dan yang tidak terikat dengan sel disebut *free coagulase*. *Bound coagulase (clumping factor)* dapat dideteksi melalui uji slide sedangkan *free coagulase* dapat dideteksi dengan uji tabung setelah koagulase dilepas oleh bakteri ke media pertumbuhan (Carter & Wise, 2004). Produksi enzim koagulase merupakan faktor patogenitas utama dari *S. aureus* sehingga menjadi pembeda dengan *Staphylococcus* lainnya (Levinson & Jawetz, 2003).

Uji koagulase yang dilakukan menunjukkan hasil positif, hal tersebut ditandai dengan terbentuknya *clot/koagulan* di dalam tabung, karena pada saat tabung diposisikan miring cairan tersebut tidak mengalir berarti bakteri tersebut *S. aureus* (Gambar 4A). Sebaliknya, hasil uji menunjukkan negatif jika pada saat tabung diposisikan miring cairan tersebut mengalir (Gambar 4B).



Gambar 4. Hasil uji koagulase

### Keterangan:

- A. Positif, terbentuk koagulan (*S. aureus*)
- B. Negatif, tidak terbentuk koagulan (bukan *S. aureus*)

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Italic, Indonesian

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Centered

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Left, Right: 0"

Formatted: Justified, Right: 0", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Right: 0", Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Italic

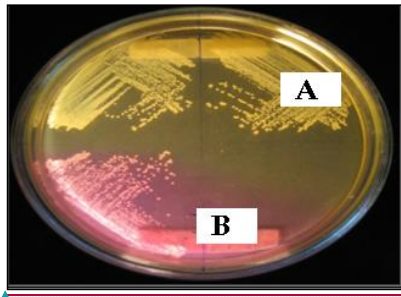
Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: English (United States)

### 3. Uji Fermentasi Manitol

Manitol merupakan senyawa hasil reduksi monosakarida manosa, yang mempunyai gugus alkohol dan memiliki rasa manis. Menurut Minor & Marth (1976), *Staphylococcus aureus* mampu memproduksi asam melalui fermentasi manitol. Pengujian fermentasi tersebut berfungsi sebagai penguat hasil uji koagulase. Uji fermentasi manitol dengan penanaman *S. aureus* pada MSA merupakan prosedur yang biasa dilakukan setelah uji koagulase. Apabila bakteri stafilokokus mampu memproduksi enzim koagulase (bersifat koagulase positif) dan mampu memfermentasi manitol pada MSA maka bakteri stafilokokus tersebut adalah *S. aureus* (Johnson & Case, 1995). Hasil uji fermentasi manitol pada *S. aureus* dinyatakan positif apabila tampak terjadi perubahan warna pada medium MSA merah muda menjadi kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa *S. aureus* memfermentasi manitol yang kemudian menghasilkan asam laktat, sehingga dapat mengubah pH medium (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil uji fermentasi manitol pada media MSA

#### Keterangan :

- A. Positif, manitol mengalami fermentasi ditandai dengan berubahnya warna media (*S. aureus*)
- B. Negatif, manitol tidak mengalami fermentasi, warna media tetap merah muda (bukan *S. aureus*)

### 4. Uji Vogel Johnson Agar (VJA)

Hasil uji Vogel Johnson Agar (VJA) terhadap 3 isolat yang digunakan pada penelitian ini, mengarah pada kebenaran karakteristik bakteri *S. aureus*. Hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media VJA dari warna putih transparan menjadi hitam yang dikelilingi zona kuning (Gambar 6). Suwandi (1999) menyatakan bahwa, media VJA mengandung manitol, tellurite dan lithium chloride memiliki peran untuk mengisolasi bakteri yang bersifat koagulase positif, karena semua bakteri koagulase positif akan tumbuh pada media ini.

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Right: 0"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Left, Right: 0"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Justified, Right: 0", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Right: 0", Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

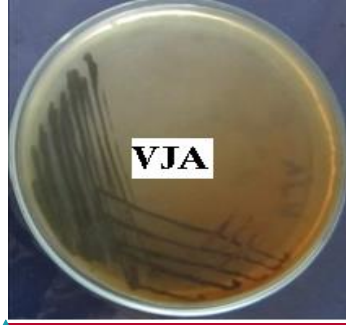
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: 12 pt

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Not Italic

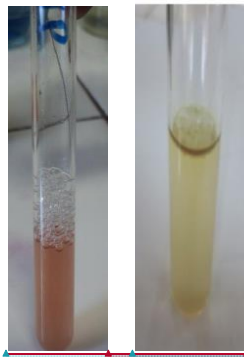


Gambar 6. Hasil uji VJA, *S. aureus* mereduksi senyawa tellurite (koloni hitam)

Pada media ini, *S. aureus* mempunyai koloni hitam sebagai akibat pengendapan hasil reduksi tellurite. Media di sekitar koloni akan berubah menjadi kuning akibat fermentasi manitol. Adanya lithium chloride sangat bermanfaat untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain.

#### 5. Uji Voges-Proskauer (VP)

Asetoin merupakan suatu produk alami yang dibentuk dari asam piruvat dalam rangkaian fermentasi glukosa dari *S. aureus*. Deteksi produksi asetoin melalui uji VP dapat menjadi alternatif untuk identifikasi *S. aureus* (Koneman *et al.*, 1992), yang juga dapat menjadi ciri khas pembeda *S. aureus* dari stafilokokus koagulase positif lainnya (Quinn *et al.*, 2002).



Gambar 7. Hasil uji Voges-Proskauer (VP)

#### Keterangan:

- A. Positif, berubahnya warna media menjadi merah muda (*S. aureus*)
- B. Negatif, media tidak mengalami perubahan warna (bukan *S. aureus*)

Hasil uji VP menunjukkan adanya kandungan asetoin yang diproduksi dalam larutan, ditandai dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah muda (Gambar 7). Hal

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Indonesian

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Right: 0", Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

tersebut juga dipertegas oleh Cappucino & Sherman (2005) mengatakan bahwa, adanya kandungan asetoin yang diproduksi dalam larutan akan merubah warna larutan dari kuning menjadi merah muda hingga merah tua.

## B. Isolasi DNA *Staphylococcus aureus*

Tahapan pertama yang dilakukan untuk dapat mengidentifikasi bakteri secara genotip adalah melakukan isolasi atau ekstraksi genom DNA bakteri. Pada penelitian ini ekstraksi kromosom DNA dilakukan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman). Perlakuan pemberian panas dan enzim katalitik dilakukan karena *S. aureus* tergolong ke dalam bakteri Gram positif yang memiliki dinding mengandung lapisan peptidoglikan tebal, protein, asam teikoat, asam teikuronat dan polisakarida (Pelczar, 1991). Karakteristik struktur dinding Gram positif yang kompleks tersebut mampu mengikat dengan kuat protein yang terdapat pada peptidoglikan, sehingga diperlukan perlakuan yang khusus dalam mengekstraksi DNanya. Hugo dan Russel (1987) menjelaskan bahwa EDTA akan bereaksi dengan dinding sel bakteri. EDTA akan mengikat ion  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  sehingga mengakibatkan hidrolisis komponen polisakarida. Ion magnesium tersebut berfungsi untuk mempertahankan integritas sel dan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat. Debris sel dibersihkan dengan melakukan sentrifugasi sehingga yang tertinggal hanya DNA.

Tahapan berikutnya untuk menyempurnakan proses pelisisan dinding bakteri ditambahkan lisozim, karena dinding sel *S. aureus* sensitif terhadap lisozim (Tortora, dkk 2007). Menurut Muladno (2002) enzim tersebut dapat menghidrolisis ikatan glikosidik  $\beta$  (1-4) dari *N-acetylglucoseamine* (NAG) dan *N-acetylmuramic acid* (NAM). Enzim proteinase K diberikan dengan tujuan untuk mendegradasi protein-protein pengotor yang terdapat pada isolat. Protein, oligopeptida dan sisa-sisa dinding sel yang merupakan residu-residu pengotor selanjutnya diekstrak dengan pelarut organik yang berfungsi untuk membantu denaturasi dan koagulasi protein. Protein sebagian besar akan mengalami presipitasi pada interfase antara fase organik dan fase *aqueous*. Fase *aqueous* yang bening dan mengandung DNA dipindahkan ke tabung Eppendorf baru. Penambahan garam, asam, etanol dan perlakuan dingin dapat mengendapkan DNA pada fase *aqueous* tersebut sehingga membentuk serabut-serabut yang warna putih. Penambahan etanol juga dapat mencuci DNA dari oligonukleotida-oligonukleotida kecil, sisa-sisa deterjen dan sisa-sisa pelarut organik yang digunakan untuk menghilangkan protein. Kemudian DNA yang diperoleh harus disimpan pada suhu  $-20^{\circ}C$  untuk menghindari terjadinya aktivitas enzim nuclease (Taylor, et al., 2005).

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic, Indonesian

Formatted: Justified, Indent: Left: 0", Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 2 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Justified, Indent: Left: 0.25", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Italic

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

### C. Amplifikasi gen 23S rRNA

Sekuen DNA yang saat ini sering digunakan untuk memantau komunitas bakteri di

alam adalah gen yang berhubungan dengan operon ribosomal (Ranjard *et al.* 2000). Di dalam ribosom, molekul RNA bekerja membawa informasi genetik dari DNA menjadi protein. RNA ribosom (rRNA) merupakan komponen utama penyusun ribosom, yaitu mencapai 65%. Pada prokariota, ribosom terdiri atas dua subunit: subunit 50S yang besar, dan subunit 30S kecil. Subunit 50S berisi 23S, 5S rRNA, dan lebih dari 30 protein. Subunit 30S rRNA terdiri atas 16S ditambah 20 protein (Doolittle, 1999). Menurut De Rijk (1995) dan Caderegn, dkk (1988) secara umum, 16S dan 23S rRNA merupakan dasar dari pohon filogenetik, sementara 5S rRNA dianggap tidak mengandung cukup panjang sekuen untuk perbandingan statistik yang signifikan. Dibandingkan dengan gen 16S rRNA, gen 23S rRNA mengandung sekuen lebih panjang, sisipan dan/atau penghapusan yang unik, dan kemungkinan resolusi filogenetik yang lebih baik karena variasi urutan yang lebih tinggi (Ludwig & Schleifer, 1994). Hunt, dkk (2006) menunjukkan bahwa 23S rRNA gen juga mengandung daerah *conserved* untuk mendesain primer dengan kesamaan derajat universal yang hampir sama dengan primer untuk gen 16S rRNA.

Pada penelitian ini sebanyak 3 isolat *S. aureus* memberikan hasil positif pada uji reidentifikasi, selanjutnya dikonfirmasi identitas spesiesnya secara molekuler. Adapun hasil yang ditemukan pada penelitian ini, ketiga isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen 23S rRNA. Primer oligonukleotida yang digunakan pada penelitian ini merupakan primer oligonukleotida spesifik untuk amplifikasi target gen 23S rRNA. Menurut Pei, *et al.* (2009) menyatakan bahwa penggunaan spesifik primer untuk amplifikasi gen 23S rRNA terbukti bermanfaat untuk identifikasi spesies dari genus *Staphylococcus*. Kondisi reaksi PCR yang digunakan pada penelitian ini sesuai untuk mengamplifikasi gen 23S rRNA yang terdapat pada genom isolat *S. aureus*. Kriteria kondisi reaksi PCR yang dimaksud meliputi predenaturasi suhu 94°C, 5 menit, denaturasi 94°C, 40 detik, *annealing* 55°C, 1 menit, elongasi 72°C, 1 menit, postelongasi 72°C, 5 menit dengan siklus 35 kali putaran. Kesesuaian kondisi amplifikasi tersebut, tampak dari hasil amplifikasi gen 23S rRNA dengan dielektroforesis menggunakan 1,5% gel agarose, yang dilanjutkan dengan visualisasi pada UV transluminator. Pada Gambar 8 tampak fragmen/band 23S rRNA teramplifikasi sangat jelas, berpita tunggal, dan berukuran 1250 bp (sesuai dengan database *GeneBank*).

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Bold

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Bold, Indonesian

Formatted: Justified, Indent: Left: 0", Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 2 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: 12 pt

Formatted: Indent: Left: 0.5", Line spacing: 1.5 lines, No bullets or numbering

Formatted: Font: 12 pt

Formatted: Indent: First line: 0", Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Font: 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Italic

Formatted: Indonesian

Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Italic

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

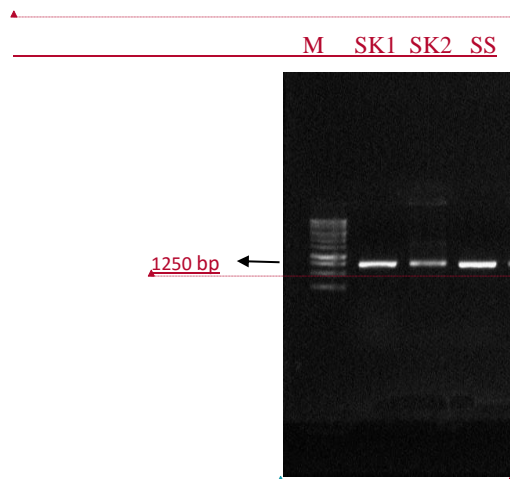
Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian



Gambar 8. Elektroforesis hasil amplifikasi gen 23S rRNA sampel *S. aureus* menggunakan agarose 1.5% berturut-turut SK1, SK2, SS dan M=Marker

#### D. Amplifikasi gen (*tst*) penyandi toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)

Dua isolat yang telah dikonfirmasi identitasnya sebagai *S. aureus*, kemudian diuji karakter keberadaan faktor virulensinya menggunakan metode PCR dengan mengamplifikasi gen (*tst*) penyandi toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini, menggunakan dua pasang primer oligonukleotida yaitu primer *tst1* dan *tst2*. Optimasi PCR menggunakan mix PCR Kapa 2G Fast Ready Mix dengan konsentrasi 12.5 µl, primer Forward (F) dan Reverse (R) masing-masing 1 µl, konsentrasi DNA template 1 µl dan konsentrasi ddH<sub>2</sub>O sebanyak 9.5 µl untuk memenuhi volume akhir tiap sampel 25 µl Tujuan optimasi PCR untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik, yaitu terbentuk pita DNA tebal dengan panjang sesuai yang diharapkan dan tidak terbentuk dimer primer, smear, atau multiband (Innis and Gelfand 1990). Data sekuen isolat yang digunakan untuk merancang primer *tst1* dan *tst2* adalah data isolat yang diperoleh dari GeneBank. Primer *tst1* didesain sendiri menggunakan program primer3 online. Primer *tst2* didesain dengan mengikuti acuan Jaulhac et al. (1991) yang telah disitasi oleh Hayakawa et al. (2000). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 2 isolat memberikan hasil positif terhadap amplifikasi gen *tst*. Hasil positif tersebut ditandai dengan munculnya fragmen DNA dengan panjang spesifik (350 bp) sesuai dengan produk PCR dari referensi dan dari database GeneBank. Hal tersebut mengindikasikan bahwa sangat mungkin kedua primer *tst1* dan *tst2* dapat menempel pada region yang sesuai di dalam genom *S. aureus* dan region

Formatted: English (United States)

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Centered, Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: Not Bold, Indonesian

Formatted: Centered, Space After: 0 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Bold

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Space After: 0 pt

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Justified, Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indent: Left: 0", Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 2 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: Italic, Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

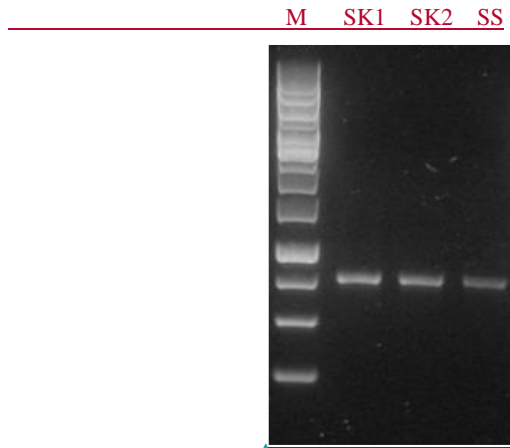
Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font color: Text 1



tersebut pada region gen *tst*. Pada Gambar 9 menunjukkan hasil visualisasi produk amplifikasi gen *tst* dengan menggunakan primer-primer tersebut. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa gen *tst* terdeteksi pada isolat *S. aureus* asal susu sapi perah maupun susu kambing.



Gambar 9. Elektroforesis hasil amplifikasi gen *tst* sampel *S. aureus* menggunakan agarose 1,5% berturut-turut SK1, SK2, SS  
M=Marker DNA

### E. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan untuk menentukan persen kemiripan genotipik isolat-isolat lokal *S. aureus* berdasarkan gen 23S rRNA. Produk sekuensing dari 2 isolat bakteri berkisar antara 350 bp sampai 1250 bp. Hasil sekuensing tersebut dibandingkan dengan beberapa sekuen DNA *S. aureus* yang ada pada Bank Gen. Perbandingan dilakukan menggunakan sekuen-sekuen yang paling mirip (*highly similar sequence*). Pada penelitian ini diperoleh hasil sekuensing 23S rRNA dengan tampaknya fragmen DNA Gambar 10a, tetapi pada hasil sekuensing gen *tst* tidak terdapat fragmen atau band DNA. Beberapa kemungkinan yang dapat menyebabkan hasil analisis sekuensing DNA buruk atau tidak tampaknya fragmen/band antara lain, yaitu : masalah pada DNA template (tidak ada atau jumlahnya sangat tidak mencukupi) dan masalah pada primer (jumlahnya sangat tidak mencukupi dan primer tidak berinteraksi dengan dengan template secara efisien) ([www.sciencebiotech.net/tag/dna-sequencing](http://www.sciencebiotech.net/tag/dna-sequencing)).

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Centered, Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Indonesian

Formatted: Font: Not Bold, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Bold

Formatted: Indonesian

Formatted: Centered, Space After: 0 pt

Formatted: Centered, Indent: Left: 0", Hanging: 1.28", Space After: 0 pt

Formatted: Indonesian

Formatted: Indonesian

Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Font color: Red, English (United States)

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

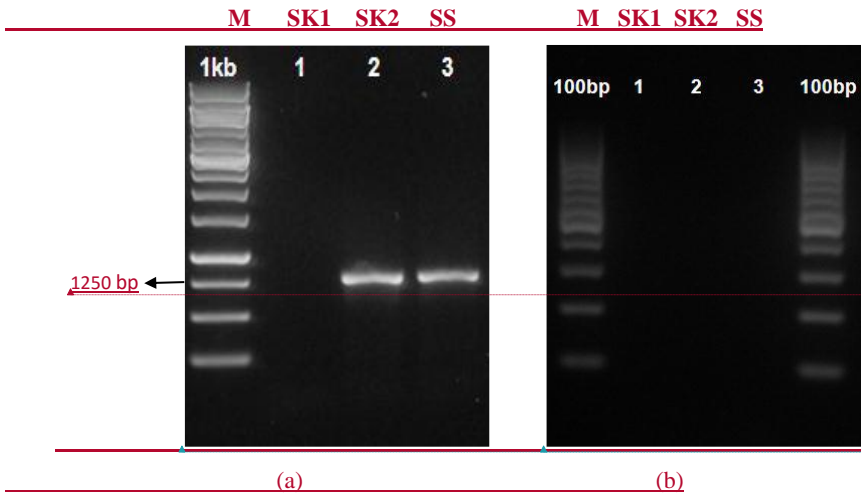
Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman





Gambar 10. Hasil sekuensing (a) 23S rRNA, (b) gen *tsf* berturut-turut SK1, SK2, SS, M=Marker DNA

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Bold

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Bold

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Not Bold

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: Italic

Formatted: Indent: Left: 0", Hanging: 1.28", Right: 0", Tab stops: Not at -0.2"

Formatted: Font: Not Bold, Italic

Formatted: Font: Not Bold

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### A. SIMPULAN

Simpulan hasil penelitian adalah dengan metode PCR gen *tst* menggunakan 23S rRNA dapat terdeteksi pada susu sapi dan susu kambing yang digunakan dalam penelitian ini. Fragmen DNA yang mengalami amplifikasi merupakan gen *tst* dari bakteri *S. aureus*.

### B. SARAN

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan dengan menggunakan *mix* (campuran yang digunakan dalam amplifikasi gen *tst*) yang berbeda agar hasil sekuensing dapat diperoleh lebih baik.

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: A, B, C, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.25" + Indent at: 0.5"

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Italic, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Bold

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

## DAFTAR PUSTAKA

- Pei, A., W, N. Carlos W, C, Pooja, J.B. Martin, Y. Liying, M. R. David, P. Zhiheng, (2009) Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. May 2009 | Volume 4 | Issue 5 | e5437. PLoS ONE | www.plosone.org
- ~~Adekeye, D. (1980). Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from animals and man in Nigeria. *Vet. Microbiol.* 5:143-150~~
- ~~Bergdoll, M.S., Crass, B.A., Reiser, R.F., Robbins, R.M. & Davis, J.P. (1981) A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with Toxic Shock Syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* i: 1017-1021.~~
- Crass, B. A., and M. S. Bergdoll. (1986). Involvement of coagulase-negative staphylococci in Toxic Shock Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 23:43-45
- Coen, D.M. (2001). Current protocols in molecular biology: The Polymerase chain reaction. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34.
- Doolittle WF (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124-2129.
- ~~Gampfer, J., Thon, V., Gulle, H., Wolf, H.M. and Eibl, M. (2002) Double mutant and formaldehyde inactivated TSST-1 as vaccine candidates for TSST-1 induced Toxic Shock Syndrome. *Vaccine* 20, 1354-1364.~~
- Gustiani, E. (2009). Pengendalian Cemaran Mikroba pada Bahan pangan Asal Teknak (Daging dan Susu) Mulai dari Peternakan sampai Dihidangkan. *Jurnal Litbang Pertanian*, 28(3), 2009
- Hayakawa Y, Akagi M, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Funaki O, Kaidoh T, Takeuchi S (2000) Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Vet Microbiol* 72: 321-327.
- Hugo, W.B and Russel, A.D 1987. Pharmaceutical Microbiology. Oxford. Blackwell Scientific Publication
- Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, et al. (2006) Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol* 72: 2221-2225

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Commented [U15]: Sumber yang diacu disesuaikan dengan yang dicantumkan dalam daftar pustaka, misal Tsang et al. 2004 belum muncul, penulisan belum konsisten, ada yang tahun dalam kurung.

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Left, Right: 0", Line spacing: 1.5 lines, Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers, Tab stops: Not at 6.5"

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Font color: Text 1

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, No underline, Font color: Text 1

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, No underline, Font color: Text 1

Formatted: Justified, Indent: First line: 0", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font color: Text 1

Formatted

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Font color: Text 1

Formatted

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

~~Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D., B and Wilfert, C. M. (1992). Zinsser microbiology. Staphylococcus aureus in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol 99: 158-166.~~

Jones, T. O., and A. A. Wieneke. (1986). Staphylococcal toxic shock syndrome. Vet. Rec. 119:435-436.

~~Kenney, K., Reiser, R.F., Bastida Corcuera, F.D., Norcross, N.L. (1993) Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology, 31, 706-707.~~  
~~Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Shreckenberger and W. C. Winn, Jr. 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J. B. Lippincott Company. Philadelphia, Pennsylvania. USA. 108 - 109, 121, 176, 194, 405, 407 - 424.~~

Lay BW. 1994. Analisis Mikrobiologi di Laboratorium. Jakarta: PT. Raja Persada

Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., Novick, R.P. (1998). The Gene for Toxic Shock Toxin is Carried by a Family of Mobile Pathogenicity Islands in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 29: 527-543.

~~Lee, P. K., B. N. Kreiswirth, J. R. Deringer, S. J. Projan, W. Eisner, B. L. Smith, E. Carlson, R. P. Novick, and P. M. Schlievert. (1992). Nucleotide sequences and biological properties of toxic shock syndrome toxin-1 from ovine- and bovine-associated *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 165: 1056-1063.~~

Ludwig W, Schleifer KH (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol Rev 15: 155-173.

Moore, P. C., and J. A. Lindsay. (2001). Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 39:2760-2767.

Nelson, F.K., Snyder. M., Gardner, A.F., Cynthia, L. H., Jay A. S., Gregory, J. P., George, M. C., Frederick, M. A., Jingyue Ju., Jan, K., and Barton, E. S. (2001). Current Protocols in Molecular Biology: Introduction and Historical Overview of DNA Sequencing. John Wiley & Sons. New York.

~~Ølsvik, O., K. Fossum, and B. P. Berdal. (1982). Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase negative strains within the family Micrococcaceae. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 90:441-444.~~  
Pelczar, M and Chan, E.C.S. (1991). Elements of Microbiology. McGraw-Hill Companies

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Indent: Left: 0", Hanging: 0.5", Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

~~Purnomo, A., Hartatik., Khusnan., Salasia, S. I. O dan Soegiyono. (2006). Isolasi dan genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java, Indonesia and Hesse, Germany. *J Vet Res Sci* 5(2): 103-109.~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

~~Salasia SIO, Anggraeni N.S, Khusnan, Sugiyono, dan Widiasih D.A. (2008). Distribusi faktor virulensi *Staphylococcus aureus* dari berbagai produk pangan asal ternak. Prosiding Seminar nasional "Peran Bioteknologi bagi Kesejahteraan Umat", Yogyakarta, 24 Mei 2008.~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

Simon, S, S dan Sanjeev, S. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*. Volume 18, Issue 12, December 2007, Pp: 1565–1568

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Sugiyono, (2008). Identifikasi Gen Enterotoksin dan *accessory gene regulator (agr)* *Staphylococcus aureus* dari berbagai pangan asal hewan dan infeksi kulit manusia. Tesis. Sain Veteriner. UGM. Yogyakarta.

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Suwito, W. (2010). Bakteri yang sering mencemari susu: deteksi, pathogenesis, epidemiologi dan cara pengendaliannya. *J. Litbang Pertanian* 29 (3).

Takeuchi, S., Ishiguro, K., Ikegami, M., Kaidoh, T., Hayakawa, Y. (1998) Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*, 59, 251-258.

Formatted: Font color: Text 1

~~Taylor, M dan Atri, S. 2005. *Development in microwave chemistry*. Evalueserve. United Kingdom~~

Formatted: Font: Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, English (United States)

~~Todar, K. (2005). *Staphylococcus*. J. Bacteriology, University of Wisconsin Department of Bacteriology, Pp. 330.~~

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

~~Tortora, G. J., B. R. Funke, dan C. L. Case. 2007. *Microbiology: an Introduction*. 9<sup>th</sup> ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, p.88.~~

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1

Thompson, N. E., E. Gómez-Lucia, and M. S. Bergdoll. (1986). Incidence of antibodies reactive with toxic shock syndrome toxin 1 in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:865-867.

Formatted: Line spacing: 1.5 lines, Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1, Superscript

Formatted: Font: 12 pt, Font color: Text 1

~~Tseng CW, Zhang S, Stewart GC. (2004). Accessory gene regulator control of *Staphylococcal enterotoxin D* gene expression. *J Bacteriology*. 186: 1793-1801~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Formatted: Justified, Line spacing: 1.5 lines

~~Administration. 1999. *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganism and Natural Toxins Handbook*. Factors Affecting the Growth of Some Foodborne Pathogens: Centre of Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). <http://vw.cfsan.fda.gov/mow/intro.html> [12 Januari 2008]~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt, Font color: Text 1

Waldvogel FA. (1995). *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In principles and practice of infectious diseases. 1754 -1777.

Williams, R.J, Ward,J.M, Henderson, B, Poole, O'Hara, B.P, Wilson, M, Nair, S.P. (2000). Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcalexotoxin-like proteins: Characterization of the prototypic gene and its product. SET1. Infect Immun 68:4407-4415

Yarwood JM, McCpr Mick JK, Paustian M.L, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. (2002). Characterisation and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. *J Biol Chem* 277: 13147-13188

**TOTAL BIAYA : Rp. 30.000.000 (tiga puluh juta rupiah)**

Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Formatted: Font color: Text 1, Indonesian

Formatted: Justified, Indent: Left: 0", Hanging: 0.49", Right: 0", Line spacing: 1.5 lines, Tab stops: 6.5", Left

Formatted: Indonesian

Formatted: Indent: Left: 0", Hanging: 0.49", Tab stops: 6.5", Left + Not at -0.2"