

Deteksi Gen Penyandi Sifat Resistensi Metisilin, Penisilin dan Tetrasiklin pada Isolat *Staphylococcus aureus* Asal Susu Mastitis Subklinis Sapi Perah

Detection of Gene Encoding Resistancy of Methicillin, Penicillin and Tetracycline of *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinical Mastitis of Dairy Cows

**Fatkhanuddin Aziz¹, Fajar Budi Lestari¹, Sarah Nuraidah², Endah Purwati²,
Siti Isrina Oktavia Salasia³**

¹ Program Studi D III Kesehatan Hewan, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

² Program Studi S1 Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

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

Email: fatkhanuddin.aziz@mail.ugm.ac.id

Abstract

Detection of gene encoding resistance of bacteria could be used as an accurate method to determine resistance of *Staphylococcus aureus* which is causing mastitis in dairy cows to the several antibiotics. This research aimed to detect the gene encoding resistance of methicillin, penicillin and tetracycline from identified *S. aureus*. Sixty milk samples were collected from subclinical mastitis of cows from various dairy farming in Yogyakarta. Isolation and identification of *S. aureus* based on the culture, Gram staining and biochemical test. Phenotypes of *S. aureus* resistances against antibiotics were carried out by disc diffusion method, meanwhile species specific gene of *S. aureus* and the gene encoding methicillin, penicillin and tetracycline were confirmed by PCR method. The results showed 11 isolates representing of Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) could be identified, wherein 5 isolates were harboring both of penicillin and tetracycline resistant genes respectively.

Key words: *Staphylococcus aureus*, resistance, antibiotics, mastitis, dairy cow

Abstrak

Deteksi gen penyandi sifat resistensi bakteri secara molekuler merupakan metode yang akurat termasuk mendeteksi kemungkinan spesies *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis pada sapi perah yang resisten terhadap metisilin, penisilin dan tetrasiklin. Penelitian ini bertujuan mendeteksi gen penyandi sifat resistensi *S. aureus* terhadap tiga antibiotik tersebut. Enam puluh sampel susu mastitis subklinis dikoleksi dari peternakan sapi perah di Yogyakarta. Isolasi dan identifikasi *S. aureus* dilakukan dengan kultur pada media selektif, pengecatan Gram dan uji biokimia. Fenotipe resistensi terhadap antibiotik ditentukan dengan metode disc diffusion, sedangkan penentuan spesies *S. aureus* dan gen penyandi sifat resistensi terhadap metisilin, penisilin dan tetrasiklin dikonfirmasi dengan teknik PCR. Hasil penelitian teridentifikasi 11 isolat *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA), dimana 5 isolat diantaranya mempunyai kombinasi gen resisten terhadap penisilin dan tetrasiklin.

Kata kunci : *Staphylococcus aureus*, resistensi, antibiotik, mastitis, sapi perah

Pendahuluan

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan salah satu bakteri penyebab mastitis yang menimbulkan kerugian ekonomi pada peternakan sapi perah dan kambing Peranakan Etawa (PE) (Purnomo *et al.*, 2006; Salasia *et al.*, 2011). Bakteri tersebut merupakan penyebab utama contagious mastitis (Petterson-Wolfe *et al.*, 2010). Sifat resistensi *S. aureus* penyebab mastitis pada ternak perah merupakan masalah serius, tidak hanya menyebabkan penyakit pada ambing ternak namun juga potensi sumber enterotoksin bagi manusia yang mengkonsumsi susu hasil perahan. Perkembangan sifat resistensi bakteri tersebut diketahui berhubungan dengan penggunaan antibiotik yang kurang tepat dan perubahan spektrum antibiotik yang digunakan dalam pengobatan (Kumar *et al.*, 2010). Akhir-akhir ini sifat resistensi *S. aureus* berkembang cepat terhadap antibiotik beta-laktam terutama penisilin termasuk metisilin sehingga menimbulkan strain baru yang dikenal *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Gentilini *et al.*, 2000; Pitkälä *et al.*, 2004; Salasia *et al.*, 2011).

Antibiotik penisilin dan tetrasiklin merupakan salah satu pilihan utama yang sering digunakan pada pengobatan mastitis (Ziv dan Storper, 1985; Subronto dan Tjahajati, 2003; Poeloengan, 2009). Penelitian resistensi *S. aureus* penyebab mastitis pada sapi perah dan kambing PE di Indonesia terhadap berbagai jenis antibiotik pernah dilaporkan oleh Poeloengan *et al.* (1992), Salasia dan Wibowo (2005), Rahayu (2010) dan Qolbaini (2014), antara lain meliputi sifat fenotipik dan genotipik pada gen penyandi sifat resistensi terhadap metisilin.

Beberapa gen penyandi sifat resistensi *S. aureus* telah teridentifikasi dan dikarakterisasi, di

antaranya *mecA* (metisilin/oxacillin), *blaZ* (penisilin G), *aacA-D* (aminoglikosida), *tetK* dan *tetM* (tetrasiklin), *ermA*, *ermB*, dan *ermC* (makrolida-linkosamid-streptogramin B) (Martineau *et al.*, 2000; Strommenger *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2010; Hammad *et al.*, 2012). Metode deteksi berbasis *polymerase chain reaction* (PCR) telah digunakan di seluruh dunia.

Pemahaman sifat resistensi yang berbasis molekuler berguna untuk pengobatan yang akurat, strategi kontrol preventif maupun skrining isolat lapangan. Penelitian mengenai sifat resistensi isolat *S. aureus* terhadap metisilin, penisilin dan tetrasiklin secara genotipik asal sapi perah di Yogyakarta bahkan Indonesia belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan mendeteksi gen resistensi *S. aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah mastitis subklinis asal Yogyakarta terhadap tiga jenis antibiotik tersebut.

Materi dan Metode

Preparasi Sampel dan Isolasi *S. aureus*

Penelitian ini menggunakan 60 sampel susu mastitis subklinis sapi perah yang diisolasi dari berbagai peternakan rakyat di Yogyakarta. Penentuan mastitis subklinis dilakukan dengan uji *Californian Mastitis Test* (CMT). Isolasi dan identifikasi *S. aureus* dilakukan melalui skrining pertumbuhan bakteri pada *Mannitol Salt Agar* (MSA), pewarnaan Gram, uji katalase, koagulase, uji Voges-Proskauer dan sifat pertumbuhan pada pelat agar darah domba 5% (PAD) yang dilakukan di Laboratorium Praktikum Program Studi Diploma III Kesehatan Hewan Sekolah Vokasi UGM. Isolat *S. aureus* positif 23S rRNA dengan kode American Type Culture Cell (ATCC) 25923 milik Balai Besar

Veteriner Wates, Kementerian Pertanian RI digunakan sebagai kontrol negatif dan isolat MRSA 1629 yang mengandung gen *mecA*, *blaZ* dan *tetK* yang diperoleh dari Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM digunakan sebagai kontrol positif gen penyandi resistensi terhadap metisilin, penisilin dan tetrasiklin.

Uji Fenotipik Sifat Resistensi Antibiotik

Uji resistensi terhadap antibiotik dilakukan dengan metode disc diffusion mengacu pada *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) versi 11.1 (2012). Jenis antibiotik yang digunakan adalah Oksasilin (5µg), Penisilin (1µg) dan Tetrasiklin (30µg) (Oxoid). Sifat resistensi terhadap metisilin ditentukan menggunakan oksasilin, sesuai dengan yang dilakukan oleh Dutka-Malen *et al.* (1995), Lina *et al.* (1999) dan Kumar *et al.* (2010). Isolat yang akan diuji ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) broth (Oxoid) dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C, setelah itu diambil 100 µl suspensi dengan konsentrasi 0,5 McFarland dan disebar pada media Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid) dengan spatula segitiga. Sensitivity disc diletakkan di atas permukaan media MHA menggunakan pinset steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona terang yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam diukur dengan satuan milimeter dan dibandingkan dengan zona standar.

Ekstraksi DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi dengan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen) sesuai prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Bakteri ditanam pada pelat agar darah selama 24 jam, pada suhu 37°C, 5-10

koloni bakteri disuspensikan dalam 180 µl buffer TE yang mengandung 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8 dan 5µl lysostaphin (1,8 U/µl). Setelah diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 µl proteinase K (14,8 mg/ml) dan 200 µl buffer AL (yang berisi reagen AL1 dan AL2). Suspensi bakteri diinkubasikan selama dua jam pada suhu 56°C, divortek supaya homogen, dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit, didinginkan pada suhu 4°C selama 10 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 6000 g selama 15 detik. Sebanyak 420 µl etanol ditambahkan ke dalam masing-masing sampel dan ditempatkan ke dalam kolom Qiamp. Setelah disentrifus dengan kecepatan 6000 g selama satu menit, kolom Qiamp ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 µl buffer AW. Kolom Qiamp disentrifus dengan kecepatan 6000 g selama tiga menit, kemudian kolom ditempatkan di atas tabung Eppendorf dan DNA yang ada pada kolom dielusi dengan 200 µl buffer. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2004).

Deteksi spesies dan gen penyandi sifat resistensi

Gen spesifik spesies dan sifat resistensi *S. aureus* dideteksi menggunakan teknik PCR dengan amplifikasi menggunakan primer spesifik sesuai program PCR yang ditentukan berdasarkan referensi pada Tabel 1. Campuran untuk PCR sebanyak 25 µl terdiri atas 2 µl primer 1 (10 pmol) (Genecraftlabs), 2 µl primer 2 (10 pmol) (Genecraftlabs), 12,5 µl PCR mix (Promega), 6,5 µl ddH₂O molecular grade (Sigma Aldrich) dan 2 µl DNA. Campuran kemudian disentrifus beberapa detik, dan dimasukkan dalam *thermal cycler* (Eppendorf) dengan program PCR predenaturasi 94°C-120 detik, denaturasi 94°C-30 detik, annealing seperti pada Tabel 1 selama 30

detik, ekstensi 72°C-60 detik/kbp dan post ekstensi 72°C-300 detik. Amplifikasi program PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis

dengan 1% agarose dan ethidium bromide kemudian divisualisasi dengan UV transluminator (Sakura), dibandingkan dengan kontrol dan marker 100 bp DNA Ladder (Vivantis).

Tabel 1. Primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi gen 23S rRNA dan gen pengkode gen resistensi

Gen	Sekuens primer	Annealing (°C)	Ukuran target (bp)	Referensi
23S rRNA	5' AGCGAGTTACAAAGGAGGAC 3' 3' AGCTCAGCCTTAACGAGTAC 5'	64	1250	Straub et al., 1999
mecA	5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' 3' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 5'	55	532	Strommenger et al., 2003
blaZ	5' ACTTCAACACCTGCTGCTTTC 3' 3' TGACCACTTTTATCA GCAACC 5'	61	173	Martineau et al., 2000
tetK	5' GTAGCGACAATAGGTAATAGT 3' 3' GTAGTGACAATAAACCTCCTA 5'	55	360	Strommenger et al., 2003
tetM	5' AGTGGAGCGATTACAGAA 3' 3' CATATGTCCTGGCGTGTCTA 5'	55	158	Strommenger et al., 2003

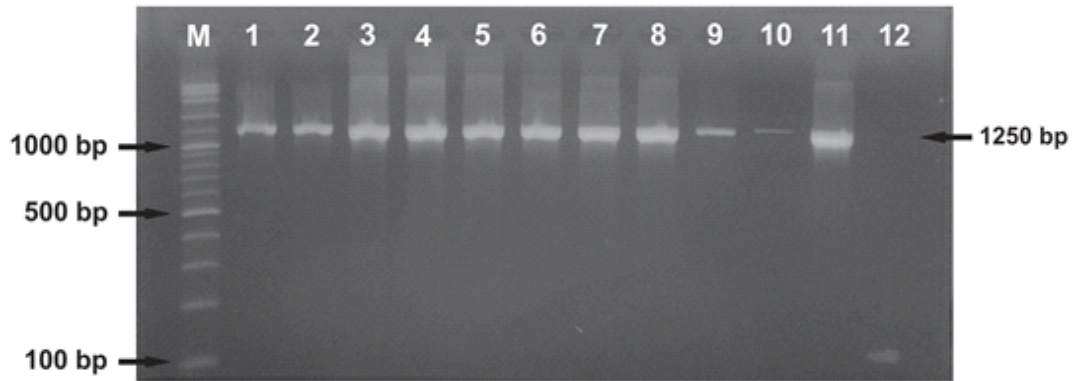
Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan dari 60 sampel yang diteliti, 11 sampel diantaranya positif mengandung *S. aureus* yang dikonfirmasi secara fenotipik dan genotipik. Berdasarkan hasil identifikasi, diketahui bahwa isolat *S. aureus* bersifat Gram positif, mampu memfermentasi manitol pada media MSA, koloni putih kompak pada media PAD dengan atau tanpa sifat hemolisis darah domba, menunjukkan reaksi positif pada uji katalase, positif uji koagulase dan positif uji VP. Hal ini sesuai dengan rujukan Quinn *et al.* (2002) dan Todar (2008), *S. aureus* merupakan Gram positif, mampu memfermentasi manitol, koloni putih kompak dengan variasi sifat hemolisis, positif pada uji

katalase, koagulase dan VP. Meskipun secara fenotipik *S. aureus* dapat diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan identifikasi mikrobiologi, akan tetapi secara genotipik *S. aureus* perlu diidentifikasi menggunakan primer spesies spesifik untuk mendeteksi gen 23S rRNA karena sering kali dikacaukan dengan *Staphylococcus* yang lain. Penentuan spesies *S. aureus* pada 11 isolat yang diuji secara molekuler ditunjukkan dengan ukuran ampikon produk PCR sebesar 1250 bp terhadap gen 23S rRNA (Gambar 1). Identifikasi molekuler *S. aureus* dengan menggunakan target gen 23S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri secara sensitif dan spesifik (Salasia *et al.*, 2004). Identifikasi *S. aureus* dari berbagai sumber dengan menggunakan primer 23S rRNA pada Tabel 1 telah

digunakan beberapa peneliti terdahulu dan menunjukkan hasil yang konsisten (Annemüller *et*

al., 1999; Akineden *et al.*, 2001; Salasia *et al.*, 2004 dan Salasia *et al.*, 2011).



Gambar 1. Gel elektroforesis hasil PCR 23S rRNA (M= marker, sumuran 1-2 kontrol positif ATCC dan MRSA, sumuran 3-11 isolat *S. aureus* dan sumuran 12 kontrol negatif).

Keberadaan *S. aureus* pada sapi perah di Yogyakarta telah diteliti sebelumnya oleh Salasia *et al.* (2004) dan Salasia *et al.* (2011). Hal ini menunjukkan eksistensi *S. aureus* dalam jangka waktu yang lama sebagai salah satu penyebab mastitis klinis dan subklinis pada suatu daerah peternakan sapi perah, sehingga merupakan salah satu ancaman strategis bagi usaha peningkatan kualitas dan kuantitas produksi susu. Ancaman tersebut menjadi penting mengingat sulitnya penanganan dan pencegahan mastitis terutama yang bersifat klinis.

Pada penelitian ini diketahui 6 (54%) isolat mempunyai gen resisten terhadap penisilin dan 7 (63%) isolat terhadap tetrasiklin dengan ukuran gen yang sesuai dengan referensi. Hasil riset yang menarik adalah 5 (45%) isolat diantaranya dengan kode R3, R4H, P2, R1H dan R4 mempunyai gen resisten terhadap kedua jenis antibiotik penisilin dan tetrasiklin yang menunjukkan adanya sifat multiresisten (Tabel 2), sedangkan 5 (45%) isolat tidak terdeteksi terhadap seluruh gen resisten.

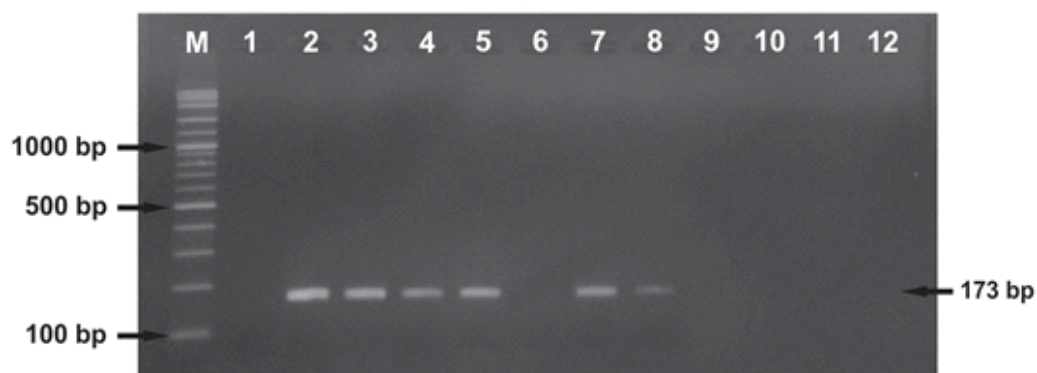
Berdasar terdeteksinya gen resisten pada *S. aureus* isolat asal susu mastitis tersebut mengindikasikan adanya ancaman yang nyata pada peternakan sapi perah di Yogyakarta, karena keberadaan *S. aureus* yang tidak hanya menyebabkan mastitis subklinis namun juga potensi resisten terhadap antibiotik yang umum digunakan yaitu golongan penisilin dan tetrasiklin.

Pengobatan terhadap infeksi *S. aureus* pada mastitis diketahui sulit dilakukan karena bakteri mudah bermutasi, terutama pada gen penyandi *penicillin binding protein*, sehingga cepat menimbulkan resistensi pada penggunaan antibiotik golongan beta-laktam (Hartman dan Tomasz, 1984; Olsen *et al.*, 2006). Infeksi *S. aureus* diketahui bersifat *contagious* sehingga cepat menyebar antar puting bahkan antar sapi. Penyebaran infeksi bakteri penyebab mastitis di lapangan terutama disebabkan buruknya manajemen pemerahan, sehingga menyebabkan penyebaran infeksi antar individu dalam sebuah peternakan.

Tabel 2. Karakter fenotipik dan genotipik sifat resistensi isolat *S. aureus*

No.	Kode Isolat	23S rRNA	Feno tipe resisten	Genotipe sifat resistensi
1.	ATCC*	+	-	-
2.	MRSA*	+	Ox, P, Tet	mecA, blaZ, tetK
3.	R3	+	P, Tet	blaZ, tetK, tetM
4.	R4H	+	P, Tet	blaZ, tetM
5.	D4	+	-	-
6.	RH2	+	-	-
7.	MN	+	-	-
8.	AY2	+	-	-
9.	P2	+	P, Tet	blaZ, tetK, tetM
10.	R1H	+	P, Tet	blaZ, tetM
11.	YG4	+	P, Tet	tetK, tetM
12.	R4	+	P, Tet	blaZ, tetK, tetM
13.	R2NH	+	-	-

Keterangan: * = kontrol positif; Ox = Oksasilin; P = Penisilin; Tet = Tetrasiklin



Gambar 2. Gel elektroforesis hasil PCR gen blaZ (M= marker, sumuran 1-2 kontrol ATCC dan MRSA, sumuran 3-11 isolat *S. aureus* dan sumuran 12 kontrol negatif).

Resistensi bakteri Staphylococcal terhadap berbagai jenis antibiotik sangat berkembang cepat terutama golongan penisilin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. aureus* yang diisolasi dari kasus mastitis subklinis di Yogyakarta mempunyai potensi resisten terhadap antibiotik beta-laktam. Proses resistensi dimediasi oleh penisilinase yang dapat menghidrolisa cincin beta-laktam struktur kimia penisilin (Hartman dan Tomasz, 1984). Gen pengkode penisilinase blaZ diketahui dibawa melalui plasmid yang memfasilitasi penyebaran yang cepat antar Staphylococcus. Secara struktural

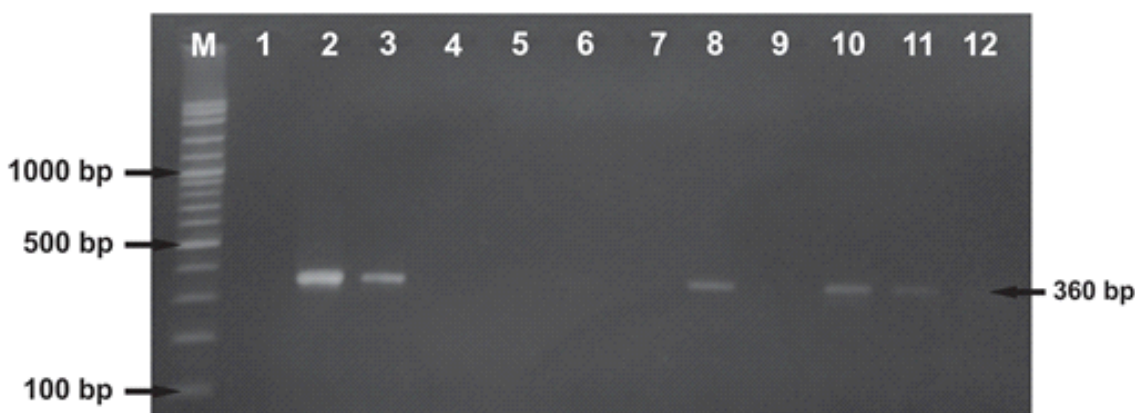
gen blaZ mempunyai represor gen blaI dan protein sinyal transduser yang disandi oleh blaRI (Hackbarth dan Chambers, 1993). Secara umum, gen ini mempunyai 4 tipe (A, B, C dan D) yang dapat dibedakan dengan serotyping dan perbedaan dalam hidrolisis substrat beta-laktam tertentu (Voladri *et al.*, 1998). Tipe A, C dan D diketahui berlokasi di plasmid dan tipe B berada di dalam kromosom. Gen blaZ juga telah ditemukan tidak hanya pada *S. aureus* namun termasuk pada Staphylococcus lain yang koagulase positif dan koagulase negatif, hal tersebut mengindikasikan bahwa gen blaZ

memainkan peranan penting sifat resistensi terhadap penisilin pada *Staphylococcus* (Olsen *et al.*, 2006).

Berdasar problem resistensi tersebut, maka dikembangkan penisilin semisintetis yang resisten beta-laktamase seperti methicillin, nafcillin, oxacillin dan dicloxacillin. Namun yang terjadi adalah *Staphylococcus* mampu berkembang menjadi resisten terhadap antibiotik semisintetis tersebut (Klevens *et al.*, 2006). *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik tersebut dikenal sebagai MRSA. Dilaporkan 30% - 50% strain *S. aureus* dan lebih dari 50% *Staphylococcus* dengan koagulase negatif resisten terhadap antibiotik semisintetis (Lowy, 1998).

Hasil penelitian diketahui bahwa semua isolat lapangan yang diperoleh, tidak mempunyai gen *mecA* seperti data yang tersaji pada Tabel 2

sehingga digolongkan sebagai *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA). Penentuan MRSA atau MSSA berdasarkan keberadaan gen *mecA* sesuai penelitian yang dilakukan oleh Strommenger *et al.* (2003). Gen *mecA* menyandi *penicillin binding protein* (PBP2a) sehingga menyebabkan antibiotik beta-laktam akan berikatan dengan protein tersebut dan tidak mempengaruhi sintesis dinding sel bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa secara molekular isolat *S. aureus* yang berasal dari sapi perah di Yogyakarta, belum mempunyai potensi terhadap kemungkinan resisten terhadap metisilin. Hasil ini berbeda dengan penelitian Qolbaini (2014) melaporkan bahwa 9 dari 49 isolat *S. aureus* yang diperoleh dari kawasan usaha peternak Cibungbulang Bogor positif terhadap gen *mecA*.



Gambar 3. Gel elektroforesis hasil PCR gen tetK (M= marker, sumuran 1-2 kontrol ATCC dan MRSA, sumuran 3-12 isolat *S. aureus*).

Dalam penelitian ini sebagian besar isolat yang mempunyai gen resisten terhadap penisilin, ternyata juga mempunyai gen resisten terhadap tetrasiklin (Tabel 2). Informasi keberadaan gen tetK dan tetM pada isolat *S. aureus* yang diisolasi dari susu mastitis sapi perah di luar Indonesia telah dilaporkan Kumar *et al.* (2010), Huber *et al.* (2011) dan Johler *et al.* (2011). Tetrasiklin merupakan

antibiotik yang umum digunakan pada manusia dan hewan. Antibiotik ini diketahui juga digunakan pada peternakan sebagai *growth promotor* dan beberapa untuk pengobatan infeksi bakterial pada tanaman (Liu *et al.*, 2009). Penggunaan yang begitu luas di berbagai negara dengan harga yang relatif murah dan pilihan kedua setelah penisilin menyebabkan semakin meningkatnya potensi resisten (Trzcinski *et*

al., 2000). Distribusi gen resisten antibiotik pada *S. aureus* berhubungan dengan fakta bahwa tetK dan tetM berlokasi pada mobile genetic elements berupa plasmid atau *conjugative transposons* (Chopra dan Roberts, 2001). Menurut Trzcinski *et al.* (2000) keberadaan gen tetK dan tetM pada isolat *S. aureus* perlu diwaspadai, karena diketahui tidak hanya menyebabkan sifat resistensi *S. aureus* terhadap tetrasiklin namun juga perlu diobservasi kemungkinan resisten pada antibiotik lain seperti doksisisiklin dan minosiklin. Hal ini menyebabkan berkurangnya pilihan jenis antibiotik yang dapat digunakan pada kasus penyakit yang disebabkan bakteri *S. aureus* tersebut.

Kesimpulan

Keberadaan isolat MSSA asal susu mastitis subklinis sapi perah di Yogyakarta yang mempunyai gen penyandi sifat resistensi terhadap penisilin dan tetrasiklin telah terdeteksi, mengindikasikan telah berkembangnya *S. aureus* multiresisten yang tidak hanya menyebabkan mastitis subklinis namun juga resisten terhadap antibiotik yang umum digunakan oleh petugas medis di lapangan.

Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Sekolah Vokasi Universitas Gadjah Mada yang telah mendanai proyek penelitian ini dengan kontrak penelitian No. 008a.21/UGM/SV-HKTL/II/2015 tanggal 02 Februari 2015.

Daftar Pustaka

- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hasan, A., Lämmle, C., Wolter, W. and Zschök, M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cow with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(5): 959-964.
- Annemüller, C., Lämmle, C. and Zschök, M. (1999) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 69: 217-224.
- BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, version 11.1, May 2012. British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Birmingham, United Kingdom
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(2), 232-260.
- Dutka-Malen, S., Charles, M., and Courvalin, P. (1995) Evaluation of the BBL® Crystal™ MRSA ID System for Rapid Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 1(1), 50-53.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., and Degregorio, O. (2000) Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83(6), 1224-1227.
- Hackbarth, C. J., and Chambers, H. F. (1993) blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 37(5), 1144-1149.
- Hammad, A. M., Watanabe, W., Fujii, T., and Shimamoto, T. (2012) Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Int. J. Food Microbiol.* 156(3), 286-289.

- Hartman B.J. and Tomasz A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158: 513–6.
- Huber, H., Giezendanner, N., Stephan, R., and Zweifel, C. (2011) Genotypes, Antibiotic Resistance Profiles and Microarray Based Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Livestock and Veterinarians in Switzerland. *Zoonoses Public Health.* 58(5), 343-349.
- Johler, S., Layer, F., and Stephan, R. (2011) Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. *J. Food Prot.* 74(11), 1852-1859.
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Tenover, F. C., McDonald, L. C., Horan, T., Gaynes, R., and National Nosocomial Infections Surveillance System. (2006) Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003. *Clinical infectious diseases.* 42(3), 389-391.
- Kumar, R., Yadav, B. R., and Singh, R. S. (2010) Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbreed cattle. *Curr. Microbiol.* 60(5), 379-386.
- Lowy, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* 339:520-532.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M. E., Leclercq, R., Vandenesch, F., and Etienne, J. (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43(5), 1062-1066.
- Liu, F., Ying, G. G., Tao, R., Zhao, J. L., Yang, J. F., and Zhao, L. F. (2009) Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution.* 157(5), 1636-1642.
- Martineau, F., Picard, F. J., Lansac, N., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. (2000) Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents, Chemother.* 44(2), 231-238.
- Olsen, J. E., Christensen, H., and Aarestrup, F. M. (2006) Diversity and evolution of *bla_Z* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(3), 450-460.
- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. and Andjones, G. M. (2010) *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. Virginia Cooperative Extension. Publication. pp 404-229.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., and Honkanen-Buzalski, T. (2004) Bovine Mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *J. Dairy Sci.* 87(8), 2433-2441.
- Poeloengan, M., Rahayu, R. D., dan Harapini, M. (1992) Pengaruh Ekstrak *Usnea* Sp. Terhadap *Staphylococcus aureus* Yang Resisten Dan Sensitif Terhadap Penisilin. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia.* 1(4 Okt).
- Poeloengan, M. (2009) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Miana (*Coleus seutellarioides* (L.) Benth) terhadap Bakteri *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus*. *J. Biotika.* 7(2), 61-68.
- Purnomo, A., Hartatik, Khusnan, Salasia, S. I. O., dan Soegiyono (2006) Isolasi dan Karakterisasi *Staphylococcus aureus* Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa. *Media Kedokteran Hewan.* 22 (3):142 – 147
- Qolbaini, E. N. (2014) Karakterisasi dan Uji Kepekaan terhadap Antibiotik Isolat Bakteri *Staphylococcus aureus* diisolasi dari Sapi Mastitis Subklinis. [Thesis]. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. and Leonard, F. C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Iowa: Blackwell Science Ltd.

- Rahayu, I. D. (2010) The sensitivity of *Staphylococcus aureus* as Mastitis Pathogen Bacteria Into Teat Dipping Antiseptic in Dairy Cows. *Jurnal Protein*. 14(1).
- Salasia, S. I. O., Khusnan, Z., Lammler, C., and Zschock, M. (2004) Comparative studies on pheno-and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J Vet. Sci.* 5 (2): 103–109.
- Salasia, S. I.O, dan Wibowo, M. H. (2005) Karakterisasi Fenotipe Isolat *Staphylococcus aureus* dari Sampel Susu Sapi Perah Mastitis Subklinis. *Jurnal Sain Veteriner*. 23.
- Salasia, S. I. O., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D. and Prabawati, F. (2011) A Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans and food in Indonesia. *J. Vet. Sci.* 12(4): 353-361.
- Straub, J. A., Hertel, C., and Hammes, W. P. (1999) A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 62(10), 1150-1156.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., and Witte, W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41(9), 4089-4094.
- Subronto dan Tjahajati, I. (2003) Ilmu Penyakit Ternak. Gadjah Mada University (UGM)-Press. Yogyakarta.
- Todar, K. (2008) *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease; *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. . Diakses : 08 Mei 2012.
- Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W., and Dowson, C. G. (2000) Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45(6), 763-770.
- Voladri, R. K. R., and Kernodle, D. S. (1998) Characterization of a Chromosomal Gene Encoding Type B β -Lactamase in Phage Group II Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicro. Agents. Chemother.* 42(12), 3163-3168.
- Ziv, G., and Storper, M. (1985) Intramuscular Treatment of Subclinical Staphylococcal Mastitis in Lactating Cows with penicillin G, Methicillin and Their esters. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 8(3), 276-283.