

Uji Pigmen dan Deteksi Kapsul Polisakarida pada *Staphylococcus aureus* Isolat Asal Broiler

PIGMENT TEST AND DETECTION OF POLISAKARIDA CAPSULES ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLAT BROILER

Khusnan, Dwi Kusmanto

Akademi Peternakan Brahmaputra Yogyakarta,
Jl. Ki Ageng Pemanahan, Nitikan Sorosutan,
Umbulharjo, Yogyakarta, Indonesia, 55162
Email: khusnanzaini@gmail.com

ABSTRAK

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen menyebabkan penyakit pada manusia dan hewan. Pada ayam broiler menyebabkan septisemia, tendosinovitis, dermatitis, endokarditis, infeksi luka kulit dan artritis serta *bumblefoot*. Kemampuan bakteri *S. aureus* menyebabkan penyakit tergantung pada faktor-faktor virulensi yang dimiliki. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui distribusi jenis produksi pigmen dan keberadaan gen kapsul polisakarida secara fenotip dan genotip sebagai faktor penentu virulensi bakteri pada 15 isolat *S. aureus* asal broiler. Uji produksi pigmen menunjukkan 86,7% isolat memproduksi pigmen kuning dan 13,3% isolat memproduksi pigmen oranye. Deteksi kapsul polisakarida secara fenotip dilakukan dengan uji hidrofobisitas dengan media *serum soft agar* (SSA) menunjukkan 53,3% isolat tumbuh kompak dan 46,7% isolat tumbuh difuse serta uji hidrofobisitas dengan metode *salt aggregation test* (SAT) menunjukkan 66,7% bersifat hidrofil dan 33,3% bersifat hidrofob. Deteksi gen kapsul polisakarida secara genotip dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menunjukkan 66,7% terdeteksi *cap5* (amplikon 361 bp) dan 33,3% terdeteksi *cap8* (amplikon 173 bp). Jenis produksi pigmen dan keberadaan kapsul polisakarida merupakan sebagian faktor virulen pada *S. aureus*.

Kata-kata kunci: *Staphylococcus aureus*; pigmen; hidrofobisitas; kapsul; broiler

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a pathogenic bacterium causing disease in humans and animals. In broilers it cause septicemia, tendosinovitis, dermatitis, endocarditis, wound infections and arthritis and bumble foot. The ability of *S. aureus* to cause disease depends on the virulence factors they bear. The purpose of this research is to investigate the distribution of pigment production type and the existence of genes of polysaccharide capsule phenotype and genotype as determinant factor of virulence of bacteria on 15 isolates of *S. aureus* from broiler. Pigment production test showed that 86.7% of isolates producing yellow pigment and 13.3% isolates produce orange pigment. The detection of polysaccharide capsules was phenotypically performed with hydrophobicity test with serum soft agar medium (SSA) showed 53.3% isolate grow compact and 46.7% isolate grown difuse and hydrophobicity test by salt aggregation test method (SAT) showed 66.7% hydrophil and 33.3% are hydrophobic. Genotype detection of polysaccharide capsule genes by polymerase chain reaction (PCR) showed 66.7% detected *cap5* (amplicon 361 bp) and 33.3% detected *cap8* (173 bp ampliole). The type of pigment production and the presence of polysaccharide capsules are some of the virulent factors in *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; pigment; hydrophibisity, capsule; broilers

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen yang dapat menyerang manusia dan hewan (Khan *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2013), serta pada unggas (Marquez *et al.*, 2009). Infeksi *S. aureus* telah menjadi masalah dalam industri peternakan unggas (McNamee dan Smyth, 2000), karena menyebabkan kerugian ekonomi (Aziza *et al.*, 2013). Pada broiler menyebabkan angka kematian tinggi, menghambat pertumbuhan dan adanya peningkatan biaya pengobatan (Rasheed, 2011). Pada ayam petelur menyebabkan angka kematian tinggi, menghambat pertumbuhan bobot badan dan penurunan produksi telur (McNamee dan Smyth, 2000).

Pada unggas bakteri *S. aureus* menyebabkan artritis, osteomielitis, sinovitis, selulit, dermatitis, endokarditis, septikemia, infeksi kulit, optalmritis dan ompalitis (Shah *et al.*, 2003; Smyth *et al.*, 2005). Pada broiler *S. aureus* menyebabkan *bumblefoot*, artritis, septisemia dan tendosinovitis (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). Penyebaran *S. aureus* dapat melalui ayam sakit, bangkai, dari proses penyembelihan sampai menjadi karkas (Jyhshiu *et al.*, 2009), dan produk olahan berbahan daging ayam (Karmi, 2013).

Bakteri *S. aureus* memiliki faktor-faktor virulensi di antaranya jenis produksi pigmen (Liu *et al.*, 2005), sifat hidrofobisitas (Wibawan dan Laemmler, 1991), keberadaan kapsul polisakarida (Vasconcelos dan Cunha, 2010). Keberadaan gen kapsul polidakarida dikodekan sebagai gen *cap5* dan gen *cap8* (Peacock *et al.*, 2002)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi jenis pigmen yang diproduksi dan deteksi kapsul polisakarida permukaan secara fenotip dan genotip. Uji hidrofobisitas menggunakan media *serum soft agar* (SSA) dan metode *salt aggregation test* (SAT). Secara genotip dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi gen kapsular pada bakteri *S. aureus* isolat asal *broiler*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 15 isolat bakteri *S. aureus* yang berasal dari ayam *broiler* yang dipelihara di peternakan ayam sekitar Yogyakarta. Isolat bakteri sebanyak 15 tersebut

telah diidentifikasi sebagai *S. aureus* (Khusnan dan Kusmanto, 2013).

Deteksi Produksi Pigmen

Uji produksi pigmen *S. aureus* dilakukan menurut Brückler *et al.* (1994). Jenis pigmen terpapar pada *membrane nitrosellulose* pada tempat penanaman isolat *S. aureus* dengan ose. *Membrane nitrosellulose* ditempelkan di permukaan media padat agar darah domba pada cawan petri, dan dengan ose isolat *S. aureus* ditanamkan dengan mengoleskan pada *membrane nitrosellulose*. Pigmen teramati setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Jenis pigmen yang diproduksi adalah oranye, kuning atau putih.

Deteksi Kapsul Polisakarida

Deteksi kapsul polisakarida secara fenotip digunakan uji hidrofobisitas melalui uji dengan metode *serum soft agar* (SSA) dan *salt aggregation test* (SAT) (Wibawan *et al.*, 1993).

Uji hidrofobisitas dengan metode SSA, dilakukan penanaman bakteri pada media SSA. Pembuatan media SSA dilakukan dengan mencampur THB (Oxoid, Jerman) hangat dengan agar base (Oxoid, Jerman) cair dan serum kelinci. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 10%. Konsentrasi 10% dibuat dari 9 mL THB dicampur dengan 1 mL agar, lalu ditambahkan 50 µL serum kelinci, kemudian dicampur sampai homogen.

Bakteri dari media THB diambil satu ujung ose dengan menggunakan ose runcing, lalu dimasukkan dalam media SSA, kemudian dicampur sampai homogen dengan *vortex*. Media SSA yang telah ditanami bakteri diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati setelah 18 jam. Uji SSA dilakukan berdasar terbentuknya ekspresi pertumbuhan bakteri yang bersifat kompak dan difusa pada media SSA. Bakteri yang bersifat hidrofob biasanya tumbuh kompak, yang bersifat hidrofil tumbuh difusa, sifat hidrofobisitas ini menunjukkan peran/keberadaan kapsular bakteri (Lestari *et al.*, 2015).

Uji Hidrofobisitas dengan Metode SAT

Uji dilakukan dengan menanam bakteri dalam kaldu *brain heart infusion* (BHI) 5 mL, diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri kemudian di-*vortex*, dipindahkan kedalam tabung dan disentrifus selama lima menit pada kecepatan 5.000 rpm. Supernatan dibuang, *pellet* yang diperoleh dicuci dengan

phosphat buffer saline (PBS) sebanyak tiga kali. Larutan bakteri dilakukan penyetaraan terhadap larutan BaSO₄, sehingga diperoleh larutan bakteri dengan konsentrasi sekitar 10⁸ sel/mL. Sebanyak 50 μ L larutan bakteri dicampur dengan 50 μ L amonium sulfat dengan konsentrasi 1,2M, 1,6, 2M, 2,4M dan 3,2M pada gelas objek, dan diratakan dengan tusuk gigi steril.

Reaksi bakteri terhadap larutan amonium sulfat dapat diamati berdasar agregasi bakteri pada berbagai tingkat konsentrasi amonium sulfat. Sifat hidrofobisitas didasarkan pada terbentuknya agregasi seperti pasir putih karena reaksi bakteri terhadap larutan amonium sulfat dengan berbagai tingkatan konsentrasi (Wibawan *et al.*, 1993)

Deteksi kapsul polisakarida secara genotip menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) (Salasia *et al.*, 2011).

Preparasi DNA. Preparasi DNA *S. aureus* dilakukan dengan menggunakan *QIAamp tissue kit* (Qiagen, Hilden, Jerman). Karakterisasi *S. aureus* terhadap gen 23S rRNA dengan menggunakan primer spesies spesifik. Bakteri ditanam pada plat agar darah selama 24 jam pada suhu 37^E°C, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8, yang mengandung 5 μ L lysostaphin (1.8 U/ μ L; Sigma). Setelah inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 μ L proteinase K (14,8 mg/mL; Sigma) dan 200 μ L buffer AL (yang berisi reagen AL1 and AL2).

Suspensi bakteri diinkubasi (3 menit pada suhu 70°C dan selama 10 menit pada suhu 95°C), kemudian setelah dipusing beberapa detik, sebanyak 420 μ L etanol ditambahkan kedalam masing-masing sampel dan ditempatkan kedalam kolom *QIAamp*. Setelah sentrifugasi selama satu menit kolom *QIAamp* ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 μ L buffer AW (Qiagen). Kolom *QIAamp* kemudian dipusing selama tiga menit, kolom kemudian ditempatkan di atas 2 mL *microtube* dan DNA yang ada pada kolom dicuci

dua kali dengan cara elusi dengan 200 μ L buffer AE. Hasil elusi sampel DNA dapat disimpan pada suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2003)

Amplifikasi gen *cap5* dan *cap8* *S. aureus*. Peneguhan keberadaan gen *cap5* dan gen *cap8* dilakukan melalui amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Identifikasi gen-gen tersebut pada isolat *S. aureus* ditentukan dengan menggunakan primer spesifik (Tabel 1)

Agarose Gel Electrophoresis. Sebanyak 10 μ L produk PCR dicampur dengan 3 μ L loading buffer, kemudian dielektroforesis menggunakan agarose 1% pada tegangan 100 volt selama 30 menit, pita DNA pada agar diwarnai dengan larutan *ethidium bromide* 0,2 μ g/mL dan divisualisasikan menggunakan UV *transilluminator*. Besarnya amplicon ditentukan dengan menggunakan penanda DNA dan besar amplicon untuk gen-gen tersebut sesuai dengan Salasia *et al.* (2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian disajikan pada Tabel 2. Uji produksi pigmen menggunakan *membrane nitrocellulose* diperoleh 86,7% isolat yang memproduksi pigmen kuning dan 13,3% isolat memproduksi pigmen oranye. Uji hidrofobisitas dengan media SSA menunjukkan 53,3% isolat tumbuh kompak dan 46,7% isolat tumbuh difusa. Uji hidrofobisitas dengan metode SAT menunjukkan 60% bersifat hidrofob, dan 40% bersifat hidrofil. Dengan teknik PCR terdeteksi 66,7% isolat memiliki gen *cap5* dan 33,3% isolat memiliki *cap8* pada amplicon 361bp dan amplicon 173bp.

Bakteri *S. aureus* dapat memproduksi tiga jenis pigmen, yaitu pigmen oranye, kuning dan putih (Salasia *et al.*, 2009). Pada penelitian ini 86,7% isolat memproduksi pigmen kuning dan 13,3% memproduksi pigmen oranye (Gambar 1). Distribusi kedua pigmen ini, pigmen orange lebih sedikit dibandingkan dengan pigmen kuning. Pigmen oranye lebih banyak ditemukan pada *S. aureus* isolat asal manusia (Liu *et al.*, 2005), dan isolat asal sapi (El-Jakee *et al.*, 2008).

Tabel 1. Primer spesifik untuk gen *cap5* dan *cap8*

Frag-men	Primer sequence (5'-3')	Produk
<i>cap5</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	361bp (Moore and Lindsay, 2001)
<i>cap8</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CAC CTA ACA TAA GGC AAG	173bp (Moore and Lindsay, 2001)

Salasia *et al.* (2009) melaporkan *S. aureus* isolat asal susu sapi dan produk pangan yang mengandung susu memproduksi pigmen oranye lebih banyak dibandingkan pigmen kuning maupun putih.

Pigmen pada *S. aureus* telah dikaitkan dengan tingkat virulensi (Liu *et al.*, 2005), dan menentukan sifat patogenisitas dari *S. aureus* (Han *et al.*, 2000). Bakteri *S. aureus* yang memproduksi pigmen kuning ataupun oranye biasanya lebih patogen dibanding yang memproduksi pigmen putih. Bakteri *S. aureus* yang memproduksi pigmen kuning lebih patogen dibanding yang memproduksi pigmen putih (Khusnan *et al.*, 2014). Bakteri *S. aureus* yang memproduksi pigmen kuning tahan terhadap fagositosis neutrofil dan dapat menyebabkan abses pada kulit (Liu *et al.*, 2005).

Secara *in vitro* *S. aureus* yang tidak memproduksi pigmen lebih banyak difagosit oleh neutrofil dibandingkan dengan yang memproduksi pigmen kuning (Khusnan *et al.*, 2014). Pigmen yang diproduksi *S. aureus* berfungsi melindungi bakteri untuk bertahan hidup dari sel-sel fagosit (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2016), dengan jalan melindungi bakteri dari stres oksidasi pada proses fagositosis dari sel-sel fagosit (Lan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008). Saviola (2018) membuktikan dengan menghambat produksi pigmen pada *S. aureus* menyebabkan bakteri

menjadi lebih sensitif terhadap stres oksidatif dan mudah terfagosit.

Pada uji hidrofobisitas dengan media SSA diperoleh hasil 53,3% isolat tumbuh kompak dan 46,7% isolat tumbuh difusa (Gambar 2). Uji hidrofobisitas dengan metode SAT 33,3% bersifat hidrofob, dan 66,7% bersifat hidrofil.

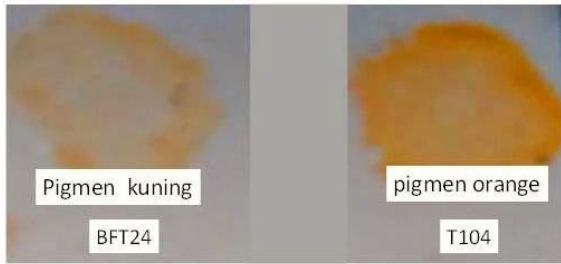
Pertumbuhan bakteri bersifat hidrofil biasanya pada media SSA membentuk koloni dengan pertumbuhan difusa, menandakan sel bakteri mengandung kapsul. Sebaliknya bakteri yang bersifat hidrofob biasanya pada media SSA tumbuh koloni yang bersifat kompak, menandakan sel bakteri tidak mengandung kapsul (Prince dan Richard, 2003). Koloni tumbuh kompak pada media SSA bersifat hidrofil pada SAT diartikan bakteri memiliki kapsul permukaan (Han *et al.*, 2000).

Sifat hidrofobisitas mempunyai hubungan dengan sifat virulensi bakteri, bakteri yang bersifat hidrofil biasanya bersifat lebih patogen dibanding bakteri yang bersifat hidrofob. Dalam penelitian ini kebanyakan *S. aureus* bersifat hidrofil, mengindikasikan bahwa isolat ini bersifat patogen. Penampilan mikrokapsul dari kultur mempunyai kaitan dengan sifat pertumbuhan pada media cair, media padat, dan sifat hidrofobisitas (Salasia, 1994).

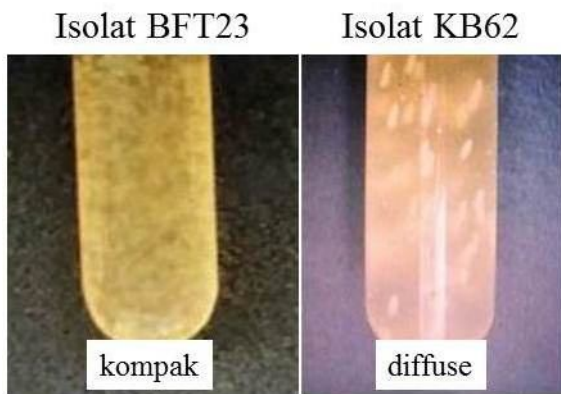
Virulensi bakteri ditentukan oleh struktur antigen utama yang terdapat di permukaan sel,

Tabel 2. Uji Serum soft agar, Uji produksi pigmen, uji hidrofobisitas, dan deteksi gen kapsul polisakarida pada *Staphylococcus aureus* isolat ayam *broiler*

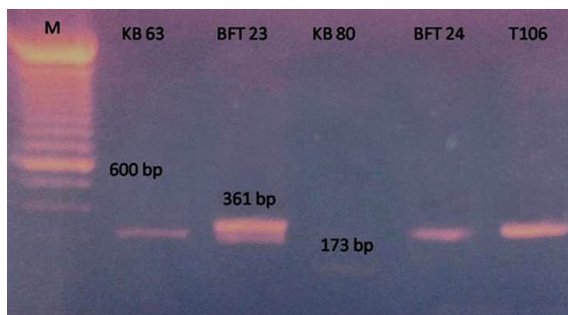
No	Kode Isolat	Uji produksi pigmen		Serum Soft Agar		Hidrofobisitas		Deteksi gen	
		Kuning	orange	kompak	diffus	Hidrofil	hidrofob	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>
1	BFT23	+		+		+		+	
2	BFT24	+		+		+			+
3	BFT120	+		+		+		+	
4	KB31	+		+		+			+
5	KB 32	+		+		+		+	
9	KB62	+			+		+	+	
6	KB63	+		+			+	+	
7	KB80	+			+		+		+
8	KB81	+			+		+		+
11	M3	+			+		+	+	
10	M5	+			+	+		+	
12	T103	+		+		+		+	
13	T104		+	+		+		+	
14	T106	+			+	+			+
15	T107		+	+		+		+	
	Persentase	86,7	13,3	53,3	46,7	66,7	33,3	66,7	33,3



Gambar 1. Produksi pigmen *Staphylococcus aureus* isolat broiler pada *membrane nitrosellulose*



Gambar 2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* isolat ayam broiler pada *Serum soft agar* (SSA)



Gambar 3. Hasil PCR *cap5* (361bp) dan *cap8* (172bp) *Staphylococcus aureus* isolat asal broiler

yaitu dinding sel, kapsul dan flagela. Kapsul bakteri tersusun oleh polisakarida atau protein. Bakteri yang mempunyai kapsul biasanya bersifat hidrofilya dan resisten terhadap fagositosis (Tizard, 1992).

Hasil uji PCR menunjukkan 100% isolat terdeteksi memiliki gen-gen kapsul polisakarida tersaji pada Gambar 3. Dengan distribusi 66,7% terdeteksi *cap5* (amplikon 361 bp) dan 33,3% terdeteksi *cap8* (amplikon 173 bp). Hasil deteksi

genotip lebih tinggi dibandingkan deteksi secara fenotip. Secara fenotip hanya 66,7% yang memiliki kapsul polisakarida. Menurut Camussone *et al.* (2012) deteksi kapsul polisakarida secara genotip hasilnya lebih tinggi dibandingkan dengan secara fenotip dan distribusinya tidak selalu ada hubungan. Perbedaan distribusi kapsular pada *S. aureus* secara fenotip dan genotip menurut Tuchscher *et al.* (2007) disebabkan karena adanya mutasi gen yang berhubungan dengan kapsul polisakarida. Adanya mutasi gen kapsular ini dibuktikan telah terjadi pada *S. aureus* isolat asal sapi (Tuchscher *et al.*, 2007).

Gen-gen kapsul polisakarida pada *S. aureus* dikodekan sebagai gen *cap5* dan gen *cap8* (Weidenmaier *et al.*, 2005). Gen *cap5* dan gen *cap8* merupakan gen penyandi kapsul polisakarida yang paling sering ditemukan pada *S. aureus* (Fischer *et al.*, 2014; Proietti *et al.*, 2010). Distribusi gen *cap5* dan gen *cap8* pada *S. aureus* hasilnya sangat bervariasi, tergantung pada geografis asal isolat (Khichar dan Kataria, 2014; Upadhyay *et al.*, 2010).

Distribusi gen *cap5* lebih tinggi dari pada gen *cap8* telah dilaporkan oleh Daum *et al.* (1994), bahwa distribusi gen kapsuler *S. aureus* isolat yang berasal dari ayam dan kalkun, distribusi yaitu sebesar 91% dan 9%. Distribusi gen *cap5* umumnya lebih tinggi dari pada gen *cap8* pada *S. aureus* isolat asal sapi dilaporkan oleh Khichar dan Kataria (2014) yaitu sebesar 92,86% dan 7,14%, Cocchiario *et al.* (2006) sebesar 82,4% dan 17,6%, Camussone *et al.* (2012), sebesar 64% dan 36%, Upadhyay *et al.* (2010) sebesar 60% dan 20%, El-Sayed *et al.* (2006) sebesar 83,3% dan 6,7% dan Singh *et al.*, (2011) sebesar 81,3% dan 18,7%. Pada bayi *cap8* lebih besar daripada gen *cap5* yaitu sebesar 52% dan 47% (Vubil *et al.*, 2017).

Kapsul polisakarida adalah komponen bakteri pada dinding sel untuk melindungi bakteri (Verdier *et al.*, 2007). Kapsul polisakarida merupakan penentu virulensi penting pada *S. aureus* (Moxon dan Kroll, 1990). Bakteri yang berkapsul lebih virulen dibandingkan dengan bakteri yang tidak mempunyai kapsul (Buzzola *et al.*, 2007). Kapsul polisakarida memainkan peran penting dalam patogenitas *S. aureus* (Glasner *et al.*, 2017).

Bakteri yang berkapsul umumnya lebih patogen dibandingkan dengan bakteri yang tidak berkapsul (Salasia dan Lämmler, 1995).

Kapsul permukaan sel bakteri juga bertanggung jawab terhadap pelekatan pada sel epitel inang (Wibawan dan Lämmler, 1990). Gen kapsuler berperan melindungi bakteri dari fagositosis (Hyams *et al.*, 2010; Kuipers *et al.*, 2016), dan imunogenisitas (Nanra *et al.*, 2013; Glasner *et al.*, 2017), karena menghambat interaksi antara *S. aureus* dan sel-sel fagosit inang (Tuchscherer *et al.*, 2007), sehingga meningkatkan kelangsungan hidup bakteri di dalam inang (O'Riordan dan Lee, 2004).

Banyaknya faktor virulen yang dimiliki oleh *S. aureus* dapat meningkatkan tingkat virulensi sehingga menimbulkan kejadian penyakit yang lebih parah sampai menimbulkan kematian inang (Kolar *et al.*, 2013). Menurut Franco *et al.* (2008) bakteri yang memiliki banyak faktor virulen bersifat lebih virulen dan dapat meningkatkan sifat patogenisitas bakteri karena virulensi *S. aureus* bersifat multi faktorial. Patogenisitas *S. aureus* merupakan proses yang kompleks dan melibatkan beragam faktor virulensi (Cotar *et al.*, 2010).

SIMPULAN

Secara fenotip semua isolat memproduksi pigmen, pigmen kuning 86,7% dan pigmen oranye 13,3%. Bakteri *S. aureus* isolat ayam broiler 66,7% bersifat hidrofili dan 33,3% hidrofob, 66,7% memiliki kapsul polisakarida. Secara genotip 66,7% isolat memiliki *cap5* dan 33,3% memiliki *cap8*. Berdasarkan jenis produksi pigmen dan keberadaan kapsul polisakarida *S. aureus* isolat asal broiler bersifat virulen.

SARAN

Pigmen dan kapsul polisakarida merupakan sebagian kecil dari faktor virulensi pada *S. aureus*, sehingga perlu riset lanjutan yang berkaitan dengan faktor virulensi lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan Penelitian Fundamental tahun 2013-2014. Kepada Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Kemendikbud diucapkan terima kasih atas bantuan dana yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aziza AMSI, Akter MR, Rahaman MS, Khan MAS, Haque ZAKM, Jahan MS, Kabir LSM. 2013. Isolation, identification and antibiogram profiles of *Staphylococcus aureus* from commercial broiler in Dinajpur District of Bangladesh with special focus on the determination of lethal effect of extracted toxin. *Sci J of Microbiol* 2(4): 74-82.
- Brückler J, Schwarz S, Untermann F. 1994. *Staphylokokken-Infektionen und – Enterotoxine*, Band. II/1, In Blobel, H. und Schlieber (eds.), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscherer LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino L, Sordelli DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* 75: 886-891.
- Camussone C, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvino LF. 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Bra. J of Microbiol* 24: 1010-1014.
- Chen F, Hongxia DH, Wang Y, Cao Q, Xu B, Zhang X, Yang N, Liu G, Cai-Guang Y, Xu Y, Jiang H, Lian F, Zhang N, Li J, Lefu L. 2016. Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits *S. aureus* virulence. *Nature Chemical Biology* 12: 174-179.
- Cocchiaro JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO, Lee JC. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 59: 948-960.
- Cotar A, Chifiriuc MC, Dinu S, Bucur M, Iordache C, Banu O, Dracea O, Larion C, Lazar V. 2010. Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections. *Int J Mol Sci* 11(12): 5273-5291.
- Daum RS, Fattom A, Freese S, Karakawa W. 1994. Capsular polysaccharide serotypes of coagulase-positive *Staphylococci* associated

- with tenosynovitis, osteomyelitis, and other invasive infections in chickens and turkeys: *evidence for new capsular types*. *Avian Dis* 38: 762-771.
- El-Jakee J, Nagwa AS, Bakry M, Zouelfakar SA, Elgabry E, El-Said WA. 2008. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and animal sources. *American-Eurasian J Agric and Environ Sci* 4(2): 221-229.
- El-Sayed A, Alber J, Laemmler C, Jages S, Zschock M, Wolter W, Castaneda-Vazquez H, 2006. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet Med* 37(2): 165-179.
- Fischer J, Lee JC, Peters G, Kahl BC. 2014. A capsular clinical *Staphylococcus aureus* isolates lack agr function. *Clin Microbiol Infect* 20: 414-417.
- Franco G, Julio C, Libertad GV, Gomez M, Sandra C, Carrillo G, Juan M, Ramirez C, Jose J. 2008. Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Mexico. *e-Gnosis* 6: 1-9.
- Glasner C, de Gofau MC, van Timmeren MM, Schulze ML, Jansen B, Tavakol M, van Wamel WJB, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Arends JP, Rossen JW, Heeringa P, van Dijk JM. 2017. Genetic loci of *Staphylococcus aureus* associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides. *Scientific ReporTS*, 7:12211. | DOI:10.1038/s41598-017-12450-z
- Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. 2013. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 68: 4-11.
- Han HR, Pak SI, Kang SW, Jong WS, Youn CJ. 2000. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. I. Capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains. *J Vet Sci* 1(1): 53-60.
- Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. 2010. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect and Immun* 78(2): 704-715.
- Jyhshiun L, Kuang-Sheng Y, Hsueh-Tao L, Jiunn-Horng L. 2009. *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility. *J of Food Protect* 3: 456-684.
- Karmi M. 2013. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry meat in Qena, Egypt. *Vet World* 6(10): 711-715.
- Khan A, Hussain R, Javed MT, Mahmood F. 2013. Molecular analysis of virulent genes (coa and spa) of *Staphylococcus aureus* involved in natural cases of bovine mastitis. *J Pak Agric Sci* 50: 739-743.
- Khichar V, Kataria AK. 2014. Capsular genotyping (*cap5k* and *cap8k*) of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle with clinical mastitis, human & veterinary medicine. *Int J of the Bioflux Society* 6(1): 30-33.
- Khusnan, Kusmanto D. 2013. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolasi Ayam Pedaging dan Kajian Virulensi pada Sel Hospes secara In vivo dan In vitro*. Laporan Penelitian Fundamental DP2M Dikti Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan
- Khusnan, Prihtiyantoro W, Mitra S. 2014. *Staphylococcus aureus* producing yellow pigment isolated from bumblefoot case in broiler chickens is more pathogenic than those of producing white pigment. *J Veteriner* 15(4): 467-473.
- Kolar SL, Ibarra JA, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, Horswill AR, Shaw LN. 2013. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence determinant stability. *Microbiol Open* 2: 18-34.
- Kuipers A, Stapels DAC, Weerwind LT, Ko Y, Ruyken M, Lee JC, van Kessel KPM, Rooijackers SHM. 2016. The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiol* 162: 1185-1194.
- Lan L, Cheng A, Dunman, PM, Missiakas CD, Golden HC. 2010 Pigment production and virulence gene expression are affected by metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *J of Bacteriol* 192(12): 3068-3077.
- Lestari FB, Salasia SIO. 2015. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from

- Dairy Cows Based on Existence of Protein-A in Serum Soft Agar Medium Toward *In Vitro* Phagocytosis Activity. *J Sain Vet* 33(2): 149-155
- Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E. 2008. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 319(58): 1391-1394.
- Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V. 2004. Sword and shield: linked group B streptococcal - hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci* 101: 14491-14496
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *JEM* 202(2): 209-215.
- Marquez CMA, Kristina GMDH, Wendy RNH, Edward OM, Sheldon LKMD. 2009. USA300 is the Predominant genotype causing *Staphylococcus aureus* septic arthritis in children the pediatric infectious. *Dis J* 28(12): 1076-1080.
- Mcnamee PT, Smyth JA. 2000. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head necrosis) of broiler chickens: a review. *Av Pathol* 29(5): 477-495.
- Moore P, Lindsay J. 2001. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol* 39: 2760-2767.
- Moxon ER, Kroll JS. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors, *Current Topics in Microbiol and Immunol* 21: 221-231.
- Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, Scully I, McNeil L, Aste-Amézaga JM, Cooper D, Jansen KU, Anderson AS. 2013. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 9(3): 480-487.
- O'Riordan K, Lee JC. 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17(1): 218-234.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70(9): 4987-4996.
- Prince JL, Richard B. 2003 Dickinson kinetics and forces of adhesion for a pair of capsular/ unencapsulated *Staphylococcus* mutant strains. *Langmuir* 19: 154-157.
- Proietti PC, Coppola C, Bietta A, Marenzoni ML, Hyatt MDR, Coletti M, Passamonti F. 2010. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy. *J Vet Med Sci* 72(11): 1443-1448.
- Rasheed BY. 2011. Isolation and identification of bacteria causing arthritis in chickens. *Iraqi J Vet Sci* 25(2): 93-95.
- Salasia SIO, Khusnan, Laemmler C, Nirwati H. 2003. Pheno-and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from human skin infections in Yogyakarta. *IJ Biotech* 612-620.
- Salasia SIO, Laemmler C. 1995. Occurrence of haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med Sci Res* 22: 763-764.
- Salasia SIO, Tato S, Sugiyono N, Ariyanti D, Prabawati F. 2011. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. *J Vet Sci* 12(4): 353-361.
- Salasia SIO**, Khusnan, Sugiyono. 2009. Distribution of enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from fresh milk and food animal origins. *J Veteriner* 10(3): 111-117.
- Salasia SIO. 1994. *Untersuhungen zu mutmablichen Pathogenitäts faktoren von Streptococcus suis*. Vet. Med. Dis. Justus-Liebig-Universität-Gießen
- Saviola B. 2018. Pigments of pathogenic bacteria. *J of Microbiol and Exp* 6(2): 2-6
- Shah MS, Rai MF, Khan SA, Aslam A, Saeed K, Khan KA. 2003. Effect of experimental yolk sac infection with *Staphylococcus aureus* on immune status of broilers. *Pak Vet J* 23: 34-44.
- Singh RS, Kumar R, Yadav BR. 2011. Distribution of pathogenic in *Staphylococcus aureus* isolated from intramammary infections in cattle and buffaloes. *Indian J of Biotechnol* 10: 410-416.
- Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ, Fitzgerald JR, Deobald CF, Bohach GA, Smyth CJ.

2005. *Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPI_{bov} are predominant among Staphylococcus aureus isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. J Med Microbiol* 54: 401-411.
- Tizard I. 1992. *An Introduction Veterinary Immunology*. Sydney. WB Saunders Company.
- Tuchscherer LPN, Gómez MI, Buzzola FR, Calvino LF, Lee JC, Sordelli DO. 2007. Characterization of a new variant of IS257 prevalent among bovine isolates of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Infect Immun* 75: 5483-5488.
- Upadhyay A, Kataria AK, Sharma R, Singh G. 2010. Capsular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle and goat mastitis by PCR targeting cap5K and cap8K genes. *Indian J Anim Sci* 80(11): 1062-1065.
- Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect* 138: 606-625.
- Vasconcelos NG, Cunha MLRS. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *J of Public Health and Epidemiol* 2(3): 29-42.
- Vubil D, Garrine U, Acacio S, Sigaúque B, Alonso PL, von Müller L, Herrmann M, Mandomando I. 2017. Molecular characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia in young children in Southern Mozambique, 2001-2009. *Front Microbiol* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00730>
- Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR, Bayer AS. 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* 191: 1771-1777.
- Wibawan IWT, Laemmler C. 1991. Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B. *J Gen Microbiol* 137(12): 2721-2725.
- Wibawan IWT, Laemmler C, Seleim RS, Pasaribu FH. 1993. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J Gen Microbiol* 139: 2173-2178.
- Wibawan IWT, Laemmler C. 1990. Properties of group B Streptococci with protein surface antigens X and R. *J of Clin Microbiol* 28(12): 2834-2836.