

Deteksi dan Analisis Filogenetik *Staphylococcal Enterotoxin-Y* Isolat Bakteri *Staphylococcus aureus* Asal Kambing Peranakan Etawah

(DETECTION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF STAPHYLOCOCCAL
ENTEROTOXIN Y OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BACTERIAL
ISOLATES FROM ETAWAH CROSSBREED GOATS)

**Fatkhanuddin Aziz^{1*}, Desy Cahya Widianingrum²,
Sarasati Windria³, Siti Isrina Oktavia Salasia⁴, Nurulia Hidayah¹,
Achmad Fauzi¹, Fauziah Fitriana¹, Riza Resita¹**

¹Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Veteriner,
Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner,
Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

³Departemen Ilmu Kedokteran Dasar,
Divisi Mikrobiologi Program Studi Kedokteran Hewan
Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadajaran

⁴Departemen Patologi Klinik,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Yacarana, Sekip Unit II, Yogyakarta, Indonesia.

E-mail: fatkhanuddin.aziz@mail.ugm.ac.id.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is known to cause inflammation of the udder in dairy mammals. It produces various types of enterotoxins that potentially act as food poisoning agents through raw milk and dairy products. *Staphylococcal enterotoxin Y* (SEY), originating from human skin disease, is reportedly resistant to heating. It causes vomiting in primate experimental animals, which shows its potential as one of the causes of food poisoning. In this study, the *sey* gene in 18 *S. aureus* isolates originating from the Peranakan Etawah goat was detected by Polymerase Chain Reaction. Then sequencing was performed on the *sey* gene from *S. aureus* MR6. The nucleotide base sequence obtained was translated into protein using EMBOSS Transeq. The SEY MR6 sequence was then compared with other SEY and other known *S. aureus* enterotoxins databases in the genbank using MultAlin. The phylogenetic tree of the compared SEY proteins was generated using MEGA Software 5.0. The results revealed 28% of isolates were positive for the *sey* gene. Furthermore, SEY^{cap} had a protein sequence homology of about 97.3% compared to another SEY from isolates from dairy cows and humans. It showed six different amino acid residue positions between the SEYs compared. Phylogenetic analysis showed a close relationship with SEY from human isolate, although still in the same cluster with SEY from a bovine isolate.

Keywords: *Enterotoxin Y*, PE goat, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRAK

Staphylococcus aureus diketahui sering menyebabkan radang ambing pada ternak perah dan memproduksi berbagai jenis enterotoksin yang berpotensi sebagai agen penyebab keracunan makanan melalui susu maupun produk olahan susu yang dikonsumsi. *Staphylococcal enterotoxin Y* (SEY) asal penyakit kulit pada manusia dilaporkan tahan terhadap uji pemanasan dan menyebabkan muntah pada hewan coba primata yang menunjukkan potensinya sebagai salah satu penyebab keracunan makanan. Pada penelitian ini, deteksi gen *sey* pada 18 isolat *S. aureus* asal kambing peranakan etawah (PE) dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), kemudian dilakukan sekuensing gen *sey* dari isolat *S. aureus* MR6. Sekuens basa nukleotida ditranslasi menjadi protein

menggunakan EMBOSS Transeq. Sekuens SEY MR6 selanjutnya dibandingkan dengan *database genebank* Bakteri SEY dan enterotoksin lain yang berasal dari isolat *S. aureus* asal manusia dan sapi menggunakan MultAlin. Pohon filogenetik dari protein SEY yang dibandingkan, dibuat menggunakan MEGA Software 5.0. Hasil PCR diketahui 28% isolat, positif gen *sey*. Analisis SEY_{cap} dari isolat *S. aureus* kambing PE diketahui mempunyai persentase protein sekuens homologi sebesar 97,3% terhadap SEY asal isolat sapi perah dan manusia. Diketahui terdapat enam posisi residu asam amino yang berbeda antar SEY yang diperbandingkan. Analisis filogenetik menunjukkan kedekatan kekerabatan dengan SEY asal manusia, namun masih satu kluster dengan SEY asal sapi.

Kata-kata kunci: enterotoksin Y; kambing PE, *Staphylococcus aureus*.

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram positif penyebab mastitis (radang ambing) pada ternak perah seperti kambing peranakan etawah (PE) dan sapi perah (Boss *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2020; Widianingrum *et al.*, 2021). Selain menyebabkan mastitis pada kambing PE dan sapi perah, diketahui susu segar merupakan sumber utama munculnya *S. aureus* dalam produk olahan susu (Verraes *et al.*, 2015). Mengonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi mikroorganisme sangatlah berbahaya dan telah diketahui dapat menyebabkan *food borne disease* pada manusia (Ewida dan Al-Hosary, 2020).

Staphylococcus aureus diketahui dapat memproduksi lebih dari 20 macam enterotoksin (Suzuki *et al.*, 2014). Salah satunya adalah *Staphylococcal enterotoxin Y* (SEY) yang merupakan enterotoksin yang relatif baru dan pertama kali dilaporkan pada tahun 2015 (Ono *et al.*, 2015). Rekombinan SEY_{bov} yang dikloning dari isolat *S. aureus* asal sapi perah yang mengalami mastitis, diketahui menyebabkan reaksi muntah pada hewan coba primata. Hal tersebut menunjukkan potensi SEY sebagai salah satu agen penyebab *food poisoning agent* (Ono *et al.*, 2019). *Staphylococcal enterotoxin Y* juga telah diidentifikasi dari isolat manusia yang menderita penyakit atopik dermatitis, diketahui terdapat tiga subtipe (SEY₁, SEY₂ dan SEY₃) yang menunjukkan korelasi pada klonal kompleks tertentu. Ketiga subtipe SEY dari isolat manusia memperlihatkan kestabilan pada perlakuan pemanasan. Selain itu, diketahui SEY mempunyai mekanisme kerja yang unik saat berinteraksi dengan sel T limfosit, yaitu berinteraksi dengan reseptor V alpha pada sel T, sedangkan mayoritas *Staphylococcal enterotoxin* lainnya spesifik bekerja pada V beta sel T. *Staphylococcal enterotoxin Y* yang berikatan dengan sel T menyebabkan aktivasi proliferasi

sel T serta produksi sitokin pro-inflamatori seperti interferon gamma, interleukin 12 dan TNF-alpha yang massif (Aziz *et al.*, 2020a).

Deteksi gen *sey* isolat *S. aureus* dari kambing PE belum pernah dilaporkan sebelumnya, sehingga perlu diteliti dan dibandingkan SEY asal kambing PE dengan SEY asal isolat manusia dan sapi perah. Analisis filogenetik SEY dari isolat asal kambing PE, manusia dan sapi perah diharapkan dapat mengungkap kekerabatan dari SEY asal inang spesies yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Isolat Bakteri

Penelitian ini menggunakan 18 isolat *S. aureus* yang diperoleh dari susu kambing PE, koleksi Laboratorium Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi Universitas Gadjah Mada. Isolat-isolat tersebut disimpan pada 15% gliserol dalam suhu -80°C dan ditumbuhkan pada Typtic Soya Agar (TSA) (Himedia, India) saat akan digunakan.

Ekstraksi DNA

Senyawa DNA *S. aureus* diekstraksi dan dipurifikasi menggunakan Presto Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid, Taiwan). Biakan murni bakteri ditumbuhkan pada TSA (Himedia, India) selama 24 jam, pada suhu 37°C, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam Gram + buffer 200 µL, kemudian ditambahkan 2 µL lysostaphin (5 ug/µL, Sigma, USA). Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 µL proteinase K (20 mg/mL, Sigma, USA) dan 200 µL buffer GB. Suspensi bakteri diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 60°C. Sebanyak 200 µL etanol ditambahkan ke dalam masing-masing sampel, divorteks dan campuran selanjutnya ditempatkan ke dalam GS kolom ekstraksi. Setelah disentrifus dengan kecepatan 14.000 x g selama satu menit, kolom ditempatkan di atas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 400 µL buffer W1 dan 600 µL Wash buffer.

Tabel 1. Primer polymerase chain reaction dan sekuensing

Tujuan	Kode Primer	Sekuen	Target (bp)	Referensi
Deteksi/ Sekuensing	<i>sey</i> F	TCTATTGGAATAGCAGAAGTA	540	Aziz <i>et al.</i> (2020a)
	<i>sey</i> R	CAATATGTCGCCTAAATCTAT		
Sekuensing	<i>sey</i> 1	CGGTTTATTTCAGTTATGGC	1677	Penelitian ini
	<i>sey</i> 2	CCAACAGGTAGTCATTTTC		

Kolom kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 x g selama tiga menit, kemudian kolom ditempatkan di atas tabung 1,5 mL steril dan DNA pada kolom dielusi dengan 50 µL buffer elusi. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Deteksi dan Sekuensing Gen *sey*

Deteksi gen *sey*, dilakukan berdasarkan penelitian Aziz *et al.* (2020a). Campuran PCR sebanyak 25 µL yang terdiri dari 5 µL mastermix (5X PCR Master Dye Mix, ExcelTaq, SMOBIO, Taiwan), 1 µL primer *sey* F (10 pmol/µL), 1 µL primer *sey* R (10 pmol/µL), 16 µL ddH₂O, dan 2 µL DNA *template*. Kontrol negatif yang digunakan ddH₂O sebagai DNA *template*. Campuran kemudian disentrifus beberapa detik, dan dimasukkan dalam *thermal cycler* (SeletCycler II Thermal Cycler, Select BioProducts, USA) dengan program PCR predenaturasi 94°C-120 detik, denaturasi 94°C-30 detik, *annealing* 52°C-30 detik, ekstensi 72°C-30 detik dan pasca ekstensi 72°C-300 detik. Amplifikasi program PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil amplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis dengan 1.5% *agarose* dan DNA *staining* (FloroSafe, First BASE, Taiwan) kemudian divisualisasi dengan *Dual LED Blue Transilluminator* (BIO-HELIX, Taiwan), dibandingkan dengan *marker* 100 bp DNA *Ladder* (SMBIO, Taiwan).

Staphylococcus aureus dengan isolat kode MR6 dipilih sebagai DNA *template* untuk sekuensing gen *sey*. Sekuens gen *sey* dilakukan dengan amplifikasi *flanking region* ± 500 bp menggunakan primer *sey*1 dan *sey*2 (Tabel 1) yang didesain berdasarkan genom *S. aureus* di *genbank* dengan nomor akses CP076823.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP076823.1>). Campuran PCR yang digunakan 12,5 µL KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA system, USA); 1 µL setiap primer *sey*1 dan *sey*2 (10 pmol/µl); 1 µL DNA *template* dan ddH₂O hingga 25 µL (total PCR reaksi). Amplifikasi target dilakukan dengan program PCR

pre-denaturasi 95°C-180 detik, denaturasi 98°C-30 detik, *annealing* 50°C-30 detik, ekstensi 72°C-120 detik dan pasca ekstensi 72°C-300 detik. Amplifikasi program PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Produk PCR kemudian dikirim ke Integrated DNA Technologies (IDT), Singapura untuk disekuensing menggunakan primer *sey*1, *sey*2, *sey* F dan *sey* R (Tabel 1).

Analisis Sekuensing

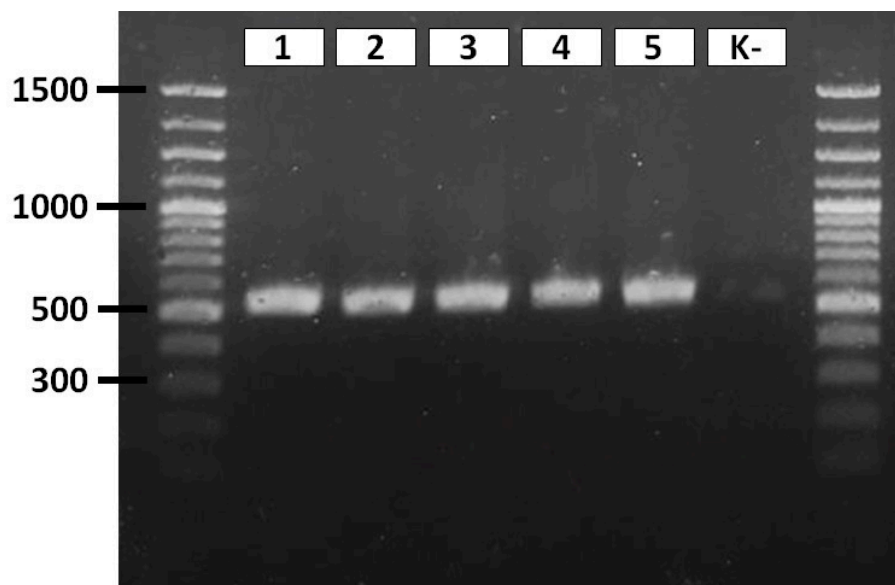
Hasil sekuensing kemudian dianalisis dengan MEGA *software* 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Sekuens basa nukleotida ditranslasi menjadi protein menggunakan EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). Sekuen SEY MR6 selanjutnya dibandingkan dengan SEY yang berasal dari isolat *S. aureus* asal manusia dan sapi menggunakan MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>). Pohon filogenetik dari protein SEY dan enterotoksin SEA-SEIX, dibuat menggunakan MEGA *Software* 5.0. Kode nomor akses *S. aureus* untuk SEA sampai SEY merujuk dari penelitian Aziz *et al.* (2020a).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil PCR menunjukkan gen *sey* terdeteksi pada 5 dari 18 (28%) dengan kode isolat MR6, SPR7, KL06, N1, dan EN3, dengan ukuran produk PCR 540 bp (Gambar 1). Selanjutnya satu isolat (MR6) dipilih untuk disekuensing. Hasil sekuensing diketahui gen *sey* dari isolat *S. aureus* MR6 mempunyai panjang nukleotida 666 bp, kemudian hasil translasi protein menunjukkan sekuens sepanjang 221 asam amino (Gambar 2). Analisis SEY dari satu isolat kambing PE memperlihatkan beberapa perbedaan urutan asam amino dari SEY asal manusia dan sapi perah yang ditunjukkan pada kode residu asam amino berwarna merah dan hitam (Gambar 2), detil kode residu dan posisi asam amino sekuens tertera pada Tabel 2. Prediksi SEY dari isolat

kambing PE mempunyai persentase protein sekuens homologi sebesar 97,3% dibanding SEY lainnya. Adanya perbedaan dengan SEY yang telah diketahui sebelumnya menunjukkan SEY asal isolat kambing PE tersebut dapat dinamai dengan sub tipe baru yaitu SEY_{cap}, merujuk pada inang/*host* isolat *S. aureus* ditemukan. Penamaan sub tipe dengan subskrip “cap”, merujuk pada asal isolat kambing PE yang mempunyai nama famili “*Caprae*” pada taksonominya (Marr *et al.*, 1993). Penelitian sebelumnya, SEY asal isolat sapi perah, dinamai dengan SEY_{bov} (Aziz *et al.* 2020a).

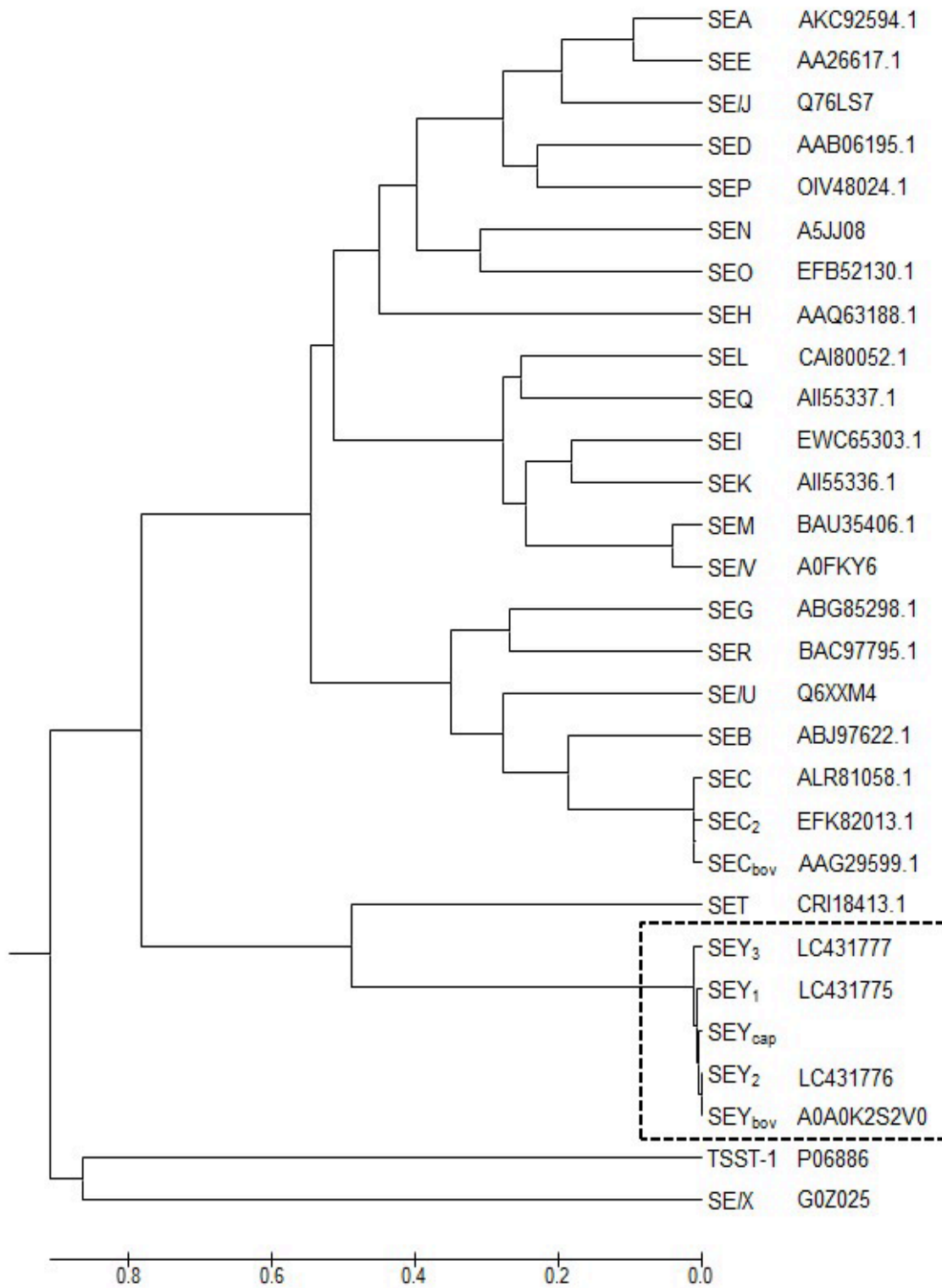
Hubungan kekerabatan antara SEY_{cap} dari isolat MR6 dengan enterotoksin *S. aureus* lainnya, dilakukan dengan analisis filogenetik. *Alignment* sekuens asam amino dilakukan dengan metode CluſtalW dan kemudian pohon filogenetik dibuat dengan metode *unweighted pair group method* (UPGMA) menggunakan Mega 5.0 *software*. Pohon filogenetik memperlihatkan semua SEY tergabung dalam satu kluster, SEY_{cap} berada pada satu sub kluster dengan SEY_{cap} dari isolat manusia dan sapi. Lebih detil, diketahui SEY_{cap} masih lebih dekat kepada SEY₂ yang berasal dari manusia, dibanding SEY_{bov} dari sapi perah (Gambar 3).



Gambar 1. Produk PCR gen *sey* pada 1.5% gel agarose. Sumuran dengan sampel kode 1-5 (isolat MR6, SPR7, KL06, N1, dan EN3) positif gen *sey*, sedangkan sumuran kode K- merupakan kontrol negatif.



Gambar 2. Hasil *alignment* SEY isolat *S. aureus* asal *host* berbeda. Sekuens protein SEY dianalisis menggunakan MultAlin. Perbedaan residu asam amino ditunjukkan dengan warna huruf berwarna biru dan hitam, kecuali residu nomor 184.



Gambar 3. Pohon filogenetik *S. aureus* enterotoksin dan SEY_{cap}. SEY dari berbagai sumber isolat tergabung dalam satu kluster (kotak putus-putus). Kode *accession numbers* *S. aureus* untuk SEA sampai SEY tertera di sebelah label enterotoksin. Garis kotak putus-putus menunjukkan grup SEY.

Tabel 2. Komparasi sekuens asam amino *Staphylococcal enterotoxin-Y Staphylococcus aureus*

SEY sub tipe	Posisi residu asam amino						Asal isolat	Genebank accession numbers
	6	20	59	69	105	184		
SEY _{cap}	W	G	V	V	Q	I	Kambing PE	-
SEY _{bov}	W	E	V	T	Q	I	Sapi perah	A0A0K2S2V0
SEY ₁	C	G	V	A	Q	V	Manusia	LC431775
SEY ₂	W	G	V	T	Q	I	Manusia	LC431776
SEY ₃	W	G	I	A	K	I	Manusia	LC431777

Keterangan: SEY= *Staphylococcal enterotoxin-Y*

Enterotoksin yang diproduksi *S. aureus* diketahui menyebabkan keracunan makanan dengan gejala klinis muntah dan mual (Hu dan Nakane, 2014). Senyawa SEY dan enterotoksin lainnya diduga bekerja dengan berikatan pada sel *mast* yang terdapat pada lamina propria usus, menyebabkan pelepasan histamin dalam jumlah yang tidak terkontrol. Enterotoksin juga menstimulus saraf vagus pada dinding organ alam abdomen/*abdominal viscera*, yang dapat menghantarkan sinyal muntah pada pusat otak. Selain efek muntah dan *toxic shock*, protein toksin juga memicu diare, yang diduga disebabkan oleh inhibisi reabsorpsi air dan elektrolit pada usus kecil (Hu dan Nakane, 2014; Ono *et al.*, 2019).

Potensi enterotoksin dalam menyebabkan keracunan makanan juga dimediasi kestabilan enterotoksin pada perlakuan pemanasan maupun enzim pencernaan seperti tripsin dan pepsin. Enterotoksin dari *S. aureus* pada umumnya tahan terhadap perlakuan pemanasan hingga 95-100°C hingga 12 jam (Nonoukon *et al.*, 2018). Diketahui SEY₁₋₃ tahan terhadap perlakuan pemanasan, sedangkan SEY_{bov} mengalami degradasi jika dipanaskan (Ono *et al.*, 2015; Aziz *et al.* 2020a). Hal tersebut salah satunya dipengaruhi oleh perbedaan residu asam amino dari sekuen protein (Marr *et al.*, 1993; Nonoukon *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, menunjukkan sekuen SEY_{cap} berbeda dengan SEY₁₋₃ dan SEY_{bov} (Tabel 2). Hal tersebut mengindikasikan potensi SEY_{cap} dari isolat kambing PE pada penelitian ini dapat menimbulkan reaksi yang sama pada manusia berupa reaksi proinflamasi dan menyebabkan keracunan makanan.

Susu kambing PE merupakan salah satu alternatif susu dari ternak perah selain susu sapi dan akhir-akhir ini semakin banyak diminati konsumen (Aziz *et al.*, 2020b). Namun, yang

perlu diperhatikan adanya kontaminasi patogen dan toksin yang diproduksi pada susu maupun produk turunannya yang dikonsumsi (Verraes *et al.*, 2015). Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan identifikasi *S. aureus* pada susu kambing PE (Windria *et al.*, 2016; Aziz *et al.*, 2020b; Widianingrum *et al.*, 2021). Gen *sey* telah terdeteksi pada 28% isolat asal susu kambing PE pada penelitian ini, sehingga perlu diwaspadai potensi isolat *S. aureus* tersebut dalam menimbulkan keracunan makanan. Selain itu, perlakuan pasteurisasi susu pada umumnya lebih rendah dari suhu 95-100°C dan hanya beberapa menit saja yaitu 72°C selama 15 detik atau 63-66 °C selama 30 menit (SNI 01-3951-1995 tentang susu pasteurisasi), hal tersebut mengindikasikan potensi bahaya susu yang terkontaminasi *S. aureus* dan enterotoksin yang diketahui tahan terhadap perlakuan pemanasan.

SIMPULAN

Gen *sey* terdeteksi pada 5/18 (28%) isolat asal kambing PE. Grup SEY memiliki kemiripan sekuens dibanding enterotoksin lainnya, diketahui SEY_{cap} dari isolat MR6 mempunyai persentase protein sekuens homologi sebesar 97,3% terhadap SEY manusia dan sapi perah. Analisis filogenetik memperlihatkan SEY_{cap} lebih dekat kepada SEY₂ yang berasal dari manusia, namun masih satu grup dengan SEY_{bov} dari sapi perah.

SARAN

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk melihat karakter biologis SEY_{cap} terhadap stabilitas pada perlakuan pemanasan, enzim pencernaan dan reaksi muntah pada hewan coba yang menunjukkan potensinya sebagai agen penyebab keracunan makanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aziz F, Hisatsune J, Yu L, Kajimura J, Sato'o Y, Ono HK, Masuda K, Yamaoka M, Salasia SIO, Nakane A, Ohge H, Kusunoki Y, Sugai, M. 2020a. *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces *Staphylococcal enterotoxin Y*, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor $V\alpha$ -Specific Expansion of T Cells. *Infection and Immunity* 88(2). e00360-19
- Aziz F, Leštari FB, Nuraida S, Purwati E, Salasia SIO. 2020b. Deteksi *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus* sp. Secara Langsung Dari Susu Segar Kambing Peranakan Etawa dengan Teknik PCR. *Jurnal Sain Veteriner* 38(2): 168-174.
- Boss R, Cosandey A, Luini M, Artursson K, Bardiau M, Breitenwieser F, Hehenberger E, Lam T, Mansfeld M, Michel A, Mösslacher G, Naskova J, Nelson S, Podpečan O, Raemy A, Ryan E, Salat O, Zangerl P, Steiner A, Graber HU. 2016. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science* 99(1): 515-528.
- Ewida RM, Al-Hosary AA. 2020. Prevalence of enterotoxins and other virulence genes of *Staphylococcus aureus* caused subclinical mastitis in dairy cows. *Veterinary World* 13(6): 1193-1198.
- Hu DL, Nakane A. 2014. Mechanisms of *staphylococcal enterotoxin*-induced emesis. *European Journal of Pharmacology* 722: 95-107.
- Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Luper M, Davis WC, Bohach GA. 1993. Characterization of Novel Type C Staphylococcal Enterotoxins: Biological and Evolutionary Implications. *Infection and Immunity* 61(10): 4254-4562.
- Nanoukon C, Affolabi D, Keller D, Tollo R, Riegel P, Baba-Moussa L, Prévost G. 2018. Characterization of human type C enterotoxin produced by clinical *S. epidermidis* isolates. *Toxins* 10(4): 139.
- Ono HK, Sato'o Y, Narita K, Naito I, Hirose S, Hisatsune J, Asano K, Hu DL, Omoe K, Sugai M, Nakane A. 2015. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 81(20): 7034-7040.
- Ono HK, Hirose S, Narita K, Sugiyama M, Asano K, Hu DL, Nakane A. 2019. Histamine release from intestinal mast cells induced by *staphylococcal enterotoxin A* (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. *PLoS Pathogens* 15(5): e1007803.
- Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W. 2020. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *Journal of Dairy Science* 103(4): 3368-3380.
- Standar Nasional Indonesia. 1995. Susu Pasteurisasi. SNI 01-3951-1995. Jakarta. Badan Standarisasi Nasional.
- Suzuki Y, Omoe K, Hu DL, Sato'o Y, Ono HK, Monma C, Arai T, Konishi N, Kato R, Hirai A, Nakama A, Kai A, Kamata Y. 2014. Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan. *Microbiology and Immunology* 58(10): 570-580.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Verraes C, Vlaemynck G, Van Weyenberg S, De Zutter L, Daube G, Sindic M, Uyttendaele M, Herman L. 2015. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* 50: 32-44.
- Widaningrum DC, Windria S, Aziz F, Salasia SIO. 2021. *Classical Enterotoxin Genes of Staphylococcus aureus Isolated from the Raw Milk of Cows and Goats in Yogyakarta Indonesia*. Paper presented at the 2nd International Conference on Veterinary, Animal, and Environmental Sciences (ICVAESS 2020).
- Windria S, Widaningrum, DC, Salasia SIO. 2016. Identification of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci isolates from mastitis milk of Etawa Crossbred Goat. *Research Journal of Microbiology* 11(1): 11-19.