

**RESPON NEUTROFIL, ADESI PADA SEL EPITEL, AGLUTINASI
ERITROSIT TERHADAP *Staphylococcus aureus* :
KAJIAN HIDROFOBISITAS *IN VITRO***

RESPONSE OF NEUTROPHILS, EPITHELIAL CELLS ADHESION, ERYTHROCYTES
AGGLUTINATION OF *Staphylococcus aureus* :
STUDY OF HYDROPHOBICITY IN VITRO

Khusnan¹ dan Siti Isrina Oktavia Salasia²

¹Akademi Peternakan Brahmputra, Yogyakarta

²Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta,

ABSTRAK

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri potensial sebagai penyebab utama mastitis pada sapi perah. Mastitis dapat menyebabkan kerugian ekonomi peternak akibat turunnya produksi susu. Infeksi bakteri dapat terjadi melalui kemampuan bakteri memasuki hospes, berkembang biak, merusak jaringan inang dan mampu bertahan dalam tubuh hospes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan sifat hidrofobitas *S. aureus* dan kemampuannya terhadap aglutinasi eritrosit, pelekatan dengan sel epitel dan kemampuan bertahan terhadap fagositosis sel polimorfonuklear. Dari 10 isolat *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian ini, terdapat 8 isolat bersifat hidrofob dan 2 isolat bersifat hidrofil. Diantara isolat yang bersifat hidrofob terdapat 2 isolat mempunyai kemampuan mengaglutinasi eritrosit sapi perah, kambing, domba. *Staphylococcus aureus* yang bersifat hidrofob dan hemaglutinasi positif, lebih banyak melekat pada sel-sel epitel bukalis dan lebih banyak difagosit oleh sel-sel PMN dibanding isolat yang bersifat hidrofob tetapi hemaglutinasi negatif maupun isolat yang bersifat hidrofil. Isolat yang bersifat hidrofil tidak mampu mengaglutinasi eritrosit dan lebih sedikit melekat pada sel-sel epitel dan lebih sedikit difagosit oleh sel-sel PMN.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, hidrofobitas, hemaglutinasi, adesi, fagositosis

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is recognized as a major pathogen causing mastitis in dairy cows. The disease causes a significant economic loss due to decreasing of milk production. The bacteria could infect the host through their ability to interact with the host, spreading in the host, damaging tissues, and their ability to survive in the host. The research was done to determine the relationship between hydrophobicity properties of *S. aureus* with hemagglutination, adhesion to epithelial cells and phagocytic activities of polymorphonuclear cells. Among the 10 *S. aureus* isolates used in this study, showed that 8 isolates were hydrophobic and 2 isolates were hydrophilic. Two cultures with hydrophobic surfaces agglutinated erythrocytes of cow, goat, and sheep. These cultures adhered in high numbers to epithelial cells and were more prone to be phagocytosed by polymorphonuclear leucocytes. The cultures with hydrophilic surfaces showed no comparable reaction.

Key words: *Staphylococcus aureus*, hydrophobicity, hemagglutination, adhesion, phagocytose

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang berpotensi merugikan peternak sapi perah, karena *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab utama mastitis pada sapi perah (Swart *et al.*, 1984; Shah *et al.*, 1985). Watts *et al.* (1986) melaporkan bahwa *S. aureus* merupakan patogen utama yang sering menyebabkan mastitis subklinis dan kronis. Agus (1991) melaporkan bahwa diantara 56 ekor sapi perah di peternakan sapi perah Baturaden, 41 ekor (73,2%) menderita mastitis subklinis, dan 9,1% diantaranya disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*. Smith *et al.* (1998) melaporkan bahwa wabah mastitis di Amerika Serikat pernah disebabkan oleh agen tunggal *Staphylococcus aureus* dengan strain yang sama.

Untuk dapat menimbulkan suatu penyakit, bakteri harus mempunyai sifat patogen sehingga mampu memasuki sel hospes, berkembang biak dalam jaringan, mampu bertahan dalam tubuh hospes, dan mampu merusak sel atau jaringan hospes. Adesi bakteri pada sel-sel hospes merupakan langkah yang sangat penting untuk mengetahui patogenesis suatu infeksi. Mekanisme adesi antara hospes dengan bakteri dapat digunakan untuk menentukan cara pencegahan, diagnosis dan pengobatan infeksi bakteri (Salasia, 2001). Sifat hidrofobisitas pada permukaan bakteri bertanggung jawab terhadap fase pelekatan awal kultur. Kolonisasi bakteri pada sel-sel epitel mukosa merupakan langkah pertama dalam proses infeksi bakteri. Bakteri yang mempunyai protein dengan sifat hidrofob lebih banyak melekat pada sel-sel epitel dan mudah difagosit oleh sel-sel polimorfonuklear leukosit (Salasia dan Lämmler, 1995; Salasia, 2001).

Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh hospes terhadap infeksi bakterial. Neutrofil berperan dalam menyingkirkan bakteri, fagositosis dan membunuh bakteri (bakterisidal) (Feldman *et al.*, 2000).

Eritrosit dapat digunakan sebagai indikator virulensi bakteri, Streptokokus yang dapat mengaglutinasi eritrosit memiliki fimbria pada permukaan sel. Fimbria pada permukaan sel bakteri sering disebut sebagai hidrofobin yang bertanggung jawab terhadap interaksi bakteri dengan eritrosit (Gottschalk *et al.*, 1990). Hemaglutinin dan fimbria mempunyai arti sebagai adesi untuk pelekatan bakteri baik Gram negatif maupun positif pada sel epitel hospes (Chanter *et al.*, 1993). Hubungan antara sifat-sifat hemaglutinasi dan kemampuan bakteri untuk melekat pada sel-sel hospes telah diteliti pada berbagai spesies bakteri (Kurl *et al.*, 1989; Wibawan *et al.*, 1993; Salasia dan Lämmler, 1994; Salasia dan Lämmler, 1995).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara sifat hidrofobisitas *S. aureus* dengan kemampuan mengaglutinasi eritrosit, kemampuan adesi pada sel epitel bukalis, dan pertahanan terhadap fagositosis sel-sel polimorfonuklear.

MATERI DAN METODE

Isolat *Staphylococcus aureus*

Digunakan 10 isolat *Staphylococcus aureus* yang berasal dari susu sapi perah dan 1 isolat referensi sebagai kontrol. Bakteri ditanam dalam plat agar darah domba (PAD) dan media *Todd-Hewitt broth* (THB) untuk persiapan pengujian. Isolat P 209 diperoleh dari Institute of Bacteriology and Immunology, JLU-Giessen Jerman, digunakan sebagai isolate kontrol.

Uji hidrofobisitas

Sifat hidrofobisitas bakteri ditentukan berdasar uji heksadekan, bakteri ditanam dalam 10 ml THB pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian disentrifus 3.000 rpm (Eppendorf, Germany) selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 5 ml *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,6. *Optical density* (OD) ditentukan dengan spektrofotometer (Spectronic, 21,

Bousch and Lomb, USA) dengan absorben 0,45-0,50 pada λ 540 nm dengan penambahan PBS. Suspensi bakteri sebanyak 3 ml kemudian ditambah dengan 0,8 ml *n-hexadecan* (Sigma) divorteks selama 30 detik, didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Setelah terlihat pemisahan 2 fase, fase yang terdapat dalam PBS diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan λ 540 nm (Salasia, 1994).

Uji fagositosis

Bakteri ditanam dalam 10 ml THB pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah divorteks, kultur bakteri disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm (Eppendorf, Germany) selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 10 ml PBS, diresuspensi dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm (Eppendorf, Germany) selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 5 ml PBS dan ditentukan *optical density* (OD)-nya menggunakan spektrofotometer dengan 10% transmisi pada λ 620 nm sehingga diperoleh larutan sebanyak 10^9 bakteri/ml. Suspensi yang digunakan untuk uji fagositosis adalah pengenceran larutan tersebut menjadi 10^8 bakteri/ml dalam PBS. Masing-masing larutan bakteri diambil 200 μ l dan dibagi ke dalam 2 tabung *Eppendorf* sama banyak (Salasia, 1994).

Darah yang digunakan berasal dari sapi sehat diambil dari vena jugularis sebanyak 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 1 mg/ml EDTA. Darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Lapisan plasma dibuang dengan pipet *Pasteur*, lapisan dibawahnya digunakan sebagai larutan yang mengandung sel neutrofil.

Larutan yang mengandung sel neutrofil sapi sebanyak 100 μ l dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang telah berisi 100 μ l suspensi bakteri, dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Setelah inkubasi dibuat preparat apus dari masing-masing campuran, difiksasi menggunakan metanol dan diwarnai dengan

Safranin dalam larutan PBS selama 45 menit (Barta, 1993). Indeks fagositosis sel neutrofil ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang difagositosis oleh setiap sel neutrofil dari 50 sel neutrofil pada setiap preparat apus menggunakan mikroskop (Salasia, 1994).

Uji adesi pada sel epitel

Sel-sel epitel mukosa bukalis sapi dikerok dengan menggunakan spatel kayu dan disuspensikan dalam 5 ml PBS. Setelah dicuci dua kali dengan larutan PBS, sel-sel epitel bukalis dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* (AO, USA) sehingga diperoleh larutan bakteri kira-kira 10^5 sel/ml PBS. Suspensi bakteri kemudian diencerkan menjadi 1:10 dalam PBS (10^8 bakteri/ml). Sebanyak 1 ml suspensi bakteri ditambah masing-masing dengan 1 ml suspensi sel-sel epitel bukalis sapi (10^5 sel/ml) kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C dalam *water bath*.

Uji adesi *S. aureus* pada sel epitel bukalis dilakukan dengan cara menginkubasikan suspensi bakteri dengan sel-sel epitel sapi. Bakteri ditanam dalam THB selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian disentrifus 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet disuspensi dengan PBS dan ditentukan *optical density* (OD)-nya dengan spektrofotometer pada λ 620 nm (kira-kira 10^9 bakteri/ml) (Salasia, 1994).

Sel-sel epitel bukalis dipisahkan dari bakteri yang tidak melekat dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan menggunakan 50% larutan *percoll* (Sigma). Suspensi bakteri dan sel epitel bukalis diambil dengan menggunakan pipet *Pasteur* dan dicuci dua kali dengan larutan PBS. Larutan bakteri dan sel epitel bukalis ditetaskan pada objek gelas dan dikeringkan., kemudian dilakukan pewarnaan dengan Giemsa selama 30 menit. Jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel bukalis dihitung dengan bantuan mikroskop. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang melekat pada tiap sel dari 20 sel epitel bukalis,

Tabel 1. Sifat hidrofobisitas *S. aureus* dan kemampuannya dalam mengaglutinasi eritrosit sapi perah, kambing, dan domba.

No	Kode Isolat	Sifat Hidrofobisitas	Reaksi Aglutinasi		
			Eritrosit Sapi Perah	Eritrosit Kambing	Eritrosit Domba
1.	P209	Hidrofob	+	+	+
2.	Y2-3	Hidrofob	-	-	-
3.	Y6-2	Hidrofob	+	+	+
4.	Y7-4	Hidrofob	-	-	-
5.	Y10-3	Hidrofob	-	-	-
6.	Y11-3	Hidrofil	-	-	-
7.	Y13-1	Hidrofob	-	-	-
8.	Y14-1	Hidrofob	-	-	-
9.	Y14-2	Hidrofob	+	+	+
10.	Y16-3	Hidrofil	-	-	-
11.	Y17-2	Hidrofob	-	-	-

Keterangan: + : terjadi reaksi hemaglutinasi; - : tidak ada reaksi hemaglutinasi;
P 209 : kontrol positif

pengulangan dilakukan sebanyak empat kali preparasi (Salasia, 1994 dengan modifikasi).

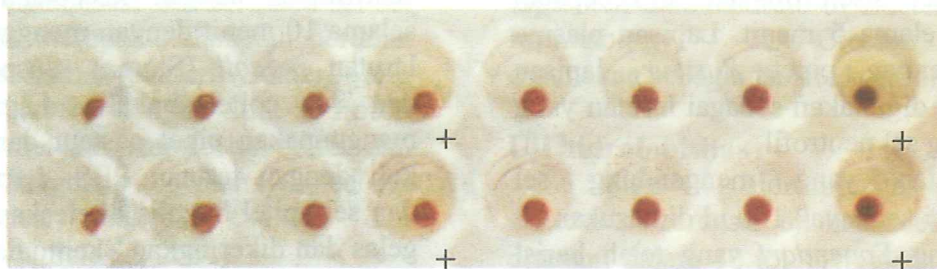
Uji hemaglutinasi

Eritrosit sapi, kambing dan domba digunakan untuk evaluasi kemampuan eritrosit dalam menaglutinasi *S. aureus*. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan 20 µl suspensi bakteri yang telah ditentukan *optical density* (OD) nya dengan spekrofotometer 10% transmisi dengan λ 620 nm (kira-kira 10⁹ bakteri/ml 0,15 NaCl) dengan 20 µl suspensi eritrosit

2% diatas gelas obyek. Gelas obyek digoyang selama 30 detik dan reaksi hemaglutinasi dicatat dengan ketentuan sebagai berikut: ++ reaksi kuat, + reaksi sedang dan - tidak ada reaksi (Wibawan *et al.*, 1993)

Analisis data

Untuk melihat hubungan antara sifat hidrofobisitas bakteri dengan sifat adesi pada sel-sel epitel dan fagositosis oleh sel-sel neutrofil, data yang diperoleh dianalisis dengan *analysis of varian* (anova).



Gambar 1. Reaksi aglutinasi antara *S. aureus* dengan sel darah merah sapi; + : menunjukkan adanya reaksi hemaglutinasi yang ditandai dengan supernatan yang tampak merah (difus); reaksi negatif terlihat dengan adanya endapan sel darah merah dengan supernatan yang jernih.

Tabel 2. Hubungan antara sifat hidrofobisitas *Staphylococcus aureus* asal susu sapi perah dengan kemampuan hemaglutinasi, pelekatan pada sel epitel dan fagositosis sel PMN

Kode Isolat	Sifat Hidrofobisitas	Reaksi Hemaglutinasi	Jumlah bakteri pada sel epitel bukalis (bakteri/sel)		Jumlah bakteri pada neutrofil (bakteri/sel)	
Y10-3	Hidrofob	-	32,40	\bar{X}	12,05	\bar{X}
Y17-2	Hidrofob	-	38,43	35,41	14,00	13,03
Y6-2	Hidrofob	+	22,15	\bar{X}	19,80	\bar{X}
Y14-2	Hidrofob	+	51,00	36,58*	20,50	20,13*
Y16-3	Hidrofil	-	18,35	\bar{X}	17,45	\bar{X}
Y11-3	Hidrofil	-	33,69	26,02	9,85	13,65

* Anova; $p < 0,05$

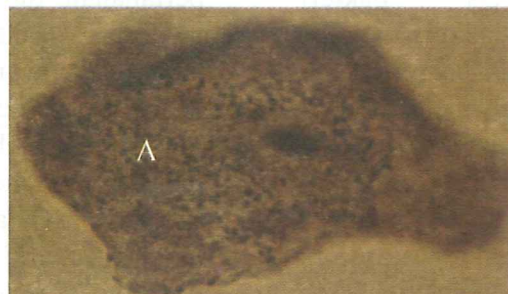
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 10 isolat *Staphylococcus aureus*, terdapat 8 isolat bersifat hidrofob dan 2 isolat bersifat hidrofil. Diantara isolat yang bersifat hidrofob terdapat 2 isolat (Y6-2 dan Y14-2) mempunyai kemampuan mengaglutinasi eritrosit sapi perah, kambing, dan domba (Tabel 1). Isolat kontrol (P209) diketahui bersifat hidrofob yang mampu mengaglutinasi eritrosit digunakan sebagai pembanding (Salasia, 1994).

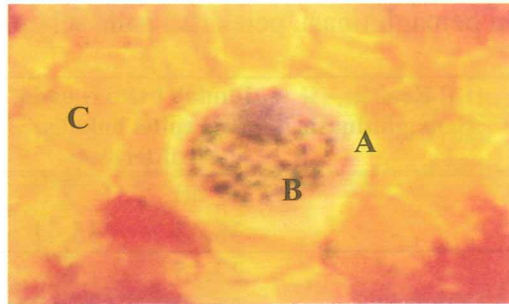
Hemaglutinin merupakan faktor adhesin untuk pelekatan bakteri pada sel epitel hospes baik Gram negatif maupun positif (Chanter *et al.*, 1993). Hubungan antara sifat-sifat hemaglutinasi dan kemampuan bakteri untuk melekat pada sel-sel hospes telah diteliti pada berbagai

spesies bakteri (Kurl *et al.*, 1989; Wibawan *et al.*, 1993; Salasia dan Lämmmler, 1994; Salasia dan Lämmmler, 1995; Salasia, 2001). Gottschalk *et al.*, (1990) melaporkan bahwa strain Streptokokus yang dapat mengaglutinasi eritrosit memiliki fimbria pada permukaan sel. Fimbria pada permukaan sel bakteri sering disebut sebagai hidrofobin bertanggung jawab terhadap interaksi bakteri dengan eritrosit.

Hubungan antara sifat hidrofobisitas *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah dengan hemaglutinasi, pelekatan pada sel epitel dan fagositosis oleh sel-sel PMN dapat dilihat pada Tabel 2. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa *S. aureus* yang bersifat hidrofob dapat melekat pada sel-sel epitel bukalis dengan jumlah lebih banyak (Gambar 1) dibanding dengan *S. aureus* yang bersifat hidrofil. Isolat yang



Gambar 2. Koloni *S. aureus* yang menempel pada sel epitel bukalis sapi perah (A). Pewarnaan Giemsa. Perbesaran mikroskop 10x10.



Gambar 3. Sel neutrofil sapi perah yang memfagosit *S. aureus*, pewarnaan dengan Safranin O; A. sel neutrofil, B. koloni *S. aureus*, C. sel darah merah. Perbesaran mikroskop 10x10.

bersifat hidrofob dan hemaglutinasi positif, mampu melekat dengan jumlah lebih banyak pada sel-sel epitel dan lebih banyak difagosit oleh sel-sel PMN (Gambar 2) dibanding isolat *S. aureus* yang bersifat hidrofob dan hemaglutinasi negatif, maupun isolat dengan sifat hidrofob negatif dan hemaglutinasi negatif.

Staphylococcus aureus yang bersifat hidrofob mempunyai kemampuan melekat pada sel-sel epitel bukalis yang jumlahnya lebih banyak, tetapi terhadap fagositosis sel-sel polimorfonuklear kemampuan pertahanannya kurang baik dibanding dengan *S. aureus* yang bersifat hidrofil. Dalam penelitian terlihat bahwa *S. aureus* yang bersifat hidrofob jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel bukalis lebih banyak dibandingkan dengan *S. aureus* yang bersifat hidrofil. Jumlah *S. aureus* yang bersifat hidrofob lebih banyak difagosit oleh sel polimorfonuklear.

Sifat hidrofobitas bakteri mempengaruhi kemampuan bakteri melekat pada sel-sel hospes. Bakteri-bakteri yang bersifat hidrofob lebih mudah melekat pada sel hospes dari pada bakteri yang bersifat hidrofil. Bakteri yang mengandung lebih banyak protein dengan komposisi sedemikian rupa, sehingga bersifat hidrofob, mempunyai kemampuan melekat lebih banyak pada sel-sel epitel dan mudah difagosit oleh sel-sel polimorfonuklear leukosit (Salasia dan Lämmmler, 1995; Salasia, 2001). Menurut Tizard (1987)

bakteri yang bersifat hidrofob seperti *Mycobacterium bovis* akan difagosit secara spontan oleh sel polimorfonuklear, sebaliknya *Streptococcus pneumoniae* yang bersifat hidrofil dengan kapsul pada permukaan selnya lebih sulit difagosit. Salasia *et al.* (1995) melaporkan bahwa *Streptococcus suis* mutan yang mempunyai sifat hidrofob lebih banyak melekat pada sel-sel epitel, sel-sel HeLa dan lebih banyak difagosit oleh makrofag maupun sel-sel polimorfonuklear (PMN) leukosit dibanding dengan *Streptococcus suis* induk yang bersifat hidrofil. Hasil serupa dilaporkan pada penelitian dengan menggunakan streptokokus grup B, yang telah dibuktikan adanya peningkatan fagositosis pada mutan berkapsul dibandingkan dengan kultur induk yang tidak berkapsul (Salasia *et al.*, 1994).

Sel netrofil berperan dalam menyingkirkan bakteri, fagositosis dan bakterisidal yang merupakan mekanisme pertahanan tubuh hospes terhadap infeksi bakterial. Bakteri memiliki faktor-faktor yang mampu melindungi diri dari reaksi hospes. Ada dua faktor yang mempengaruhi fagositosis oleh sel-sel pertahanan tubuh hospes dan mendukung virulensi bakteri. Pertama adalah produksi lapisan eksopolisakarida. Lapisan ini membuat bakteri *Staphylococcus aureus* sukar difagositosis sel neutrofil. Faktor kedua adalah adanya kapsul polisakarida yang berperan dalam meningkatkan virulensi bakteri dengan melemahkan opsonisasi yang

diperantarai komplemen (Barrio, *et al.*, 2000).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai oleh Diknas, melalui Penelitian Dasar tahun anggaran 2005. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Woro Sri Purwaningsih, SKH, Joko Purwoko, SKH, M. Husni Tamrin, dan Agus Haryadi yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus, M., 1991. Mastitis study in dairy cattle in Baturraden. *Hemerazoa*. 74, 21-24.
- Barta, O., 1993. *Monographs in Animal Immunology, Veterinary Clinical Immunology Laboratory*, Vol. 2, Bar-Lab. Inc., USA.
- Barrio, B., Vangroenweghe, F., Dosogne, H., and Burvenich, C., 2000. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime producing *Staphylococcus aureus* strain. *J. Vet. Res.* Vol. 31: 603-609
- Chanter, N., Jones P.W. and Alexander, T.J.L. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*-a speculative review. *Vet. Microbiol.* 36, 39-55.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Gottschalk, M., Higgins, R. and Beaudoin, M. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2156-2158.
- Kurl, D.N., Haataja, S. and Finne, J. 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D and G streptococci: Demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 57, 384-389.
- Salasia, S.I.O., 1994. Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus suis*. *Vet. Med. Diss.* Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Salasia, S.I.O. and Lämmle, C. 1994. Occurrence of a haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med. Sci. Res.* 22: 763-764.
- Salasia, S.I.O., Lämmle, C. and Devriese, L.A. 1994. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis* isolates from cats and dogs. *Res. Vet. Sci.* 57: 259-261.
- Salasia, S.I.O., Lämmle, C. and Herrmann, G. 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet. Microbiol.* 45: 151-156.
- Salasia, S.I.O. and Lämmle, C. 1995. Haemagglutination und Adhärenz-mechanismen von *Streptococcus suis*. *Bul. FKH UGM Vol. XIV No.2: 37-52.*
- Salasia, S.I.O., 2001. Pelekatan *Streptococcus suis* pada permukaan sel-sel hospes. *Media Veteriner.* Vol. 8, (3), 47-51.
- Shah, N.M., Kher, H.N., Dholakia, P.M. and Simaria, M.B. 1985. Studies on staphylococci in udder of cattle. *Indian Vet. J.* 62, 458-460.
- Smith, T.H., Lawrence, K.F. and Middleton, J.R. 1998. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *JAVMA.* 212, 553-556.

Swartz, R., Jooste, P.J. and Novello, J.C. 1984. Prevalence and types of bacteria associated subclinical mastitis in Bloem Fonte in dairy herds. *Vet. Assoc.* 51, 61.

Tizard, I., 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner*, (Judul asli : *An Introduction to Veterinary Immunology*), Hardjosworo, S. (Penerjemah), Edisi ke-2, Airlangga University Press, Surabaya.

Watts, J. L., Owens, W. E., and Nickerson, S.C., 1986. Identification of staphylococci from bovine udders: evaluation of the API 20GP system. *Can. J. Microbiol.* 32, 359-361.

Wibawan, I.W.T. and Lämmler, C. Seleim, R.S. and Pasaribu, F.H. 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.