

KARAKTERISASI HEMAGLUTININ *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* PENYEBAB MASTITIS SUBKLINIS PADA SAPI PERAH

CHARACTERIZATION OF HAEMAGGLUTININ OF *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ON SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY COWS

Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni¹ I Wayan Teguh Wibawan² Michael Hariyadi Wibowo¹

¹Bagian Mikrobiologi FKH-UGM, ²Bagian Imunologi FKH-IPB
E-mail: wahyuni_aeth@yahoo.com

ABSTRAK

Streptococcus agalactiae dan *Staphylococcus aureus* merupakan dua bakteri utama penyebab mastitis subklinis pada sapi perah di Indonesia. Pada mastitis subklinis kemampuan adesi mempunyai peran lebih penting dari pada kemampuan invasi. Hemagglutinin merupakan faktor yang berperan dalam proses adesi, sebagai langkah awal kolonisasi bakteri pada permukaan sel epitel ambing. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi hemagglutinin dari *S. agalactiae* dan *S. aureus*. Penentuan hemagglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* dengan uji hemagglutinasi menggunakan eritrosit sapi perah 1%. Isolasi hemagglutinin dilakukan dengan afinitas kromatografi dan analisis dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil penelitian diketahui bahwa hemagglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* dapat ditentukan dengan SDS-PAGE dengan berat molekul 28 kDa pada *S. agalactiae* dan 27 kDa pada *S. aureus*.

Kata kunci : *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, mastitis subklinis, hemagglutinin

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae dan *Staphylococcus aureus* are two main bacteria that caused subclinical mastitis in dairy cows in Indonesia. In the pathogenesis of subclinical mastitis, the adhesion process is more important as the initiation step of bacterial colonization on the mammary cell surface. Haemagglutinin play a role as adhesins in mediating the adherence of this bacteria. The aim of this research was to isolate and to characterize of haemagglutinin of *S. agalactiae* and *S. aureus*. To determine of *S. agalactiae* and *S. aureus* that had haemagglutinin were done by haemagglutination test with 1% of erythrocyte of dairy cattle. Isolation and characterization of haemagglutinin were done by using affinity chromatography technique and characterized by *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). The results of the present study showed that haemagglutinin of *S. agalactiae* and *S. aureus* could be separated by SDS-PAGE with molecular weight of 28 kDa for *S. aureus* and 27 kDa for *S. agalactiae*.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, subclinical mastitis, haemagglutinin

PENDAHULUAN

Kejadian mastitis subklinis pada sapi perah di Indonesia sangat tinggi (95-98%) dan menimbulkan banyak kerugian (Sudarwanto, 1999). *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* merupakan 2 bakteri utama penyebab mastitis subklinis (Gravekamp *et al.*, 1997; Benda *et al.*, 1997; Abrar, 2001; Wahyuni *et al.*, 2001; Wibawan *et al.*, 1997). Dari hasil penelitian diketahui bahwa *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang mempunyai hemaglutinin, mempunyai kemampuan adesi pada sel epitel ambing jauh lebih besar dari pada yang tidak mempunyai hemaglutinin. Hemaglutinin diduga sebagai faktor virulen yang penting (sebagai adesin), oleh karena itu perlu dikaji lebih lanjut tentang hemaglutinin dari kedua bakteri ini.

Selama ini penanganan mastitis dilakukan dengan pemakaian antibiotika. Seperti kita ketahui pemakaian antibiotika yang tidak tepat akan menimbulkan masalah baru yaitu adanya residu antibiotika dalam susu, alergi, resistensi serta mempengaruhi proses pengolahan hasil susu. Dari hasil penelitian Sudarwanto *et al.* (1992), 32,52% susu pasteurisasi dan 31,10% susu segar di wilayah Jakarta, Bogor dan Bandung mengandung residu antibiotika dalam jumlah yang cukup tinggi. Selain itu mastitis subklinis yang disebabkan oleh bakteri Gram positif semakin sulit ditangani dengan antibiotika karena bakteri ini sudah banyak yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotika (Wibawan *et al.*, 1998; Wahyuni *et al.*, 2001). Untuk menghindari hal tersebut maka perlu diupayakan strategi baru untuk mengatasi mastitis

Untuk pencegahan suatu penyakit perlu dipahami proses atau mekanisme infeksi dari penyakitnya. Pada mastitis subklinis kemampuan adesi sangat penting sebagai langkah awal kolonisasi bakteri di permukaan sel ambing dari pada kemampuan invasi (Wibawan., 1998). Menurut Wizeman *et al.* (2000) penghalangan/*blocking* tahap awal infeksi merupakan strategi yang efektif untuk pencegahan terjadinya infeksi bakteri. Menurut

Ofek *et al.*, (1996) kajian *in vitro* menunjukkan perlekatan bakteri pada sel inang dapat dihambat oleh berbagai faktor seperti antiserum, panas, pH. Dalam penelitian ini dikaji hemaglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang diduga sebagai faktor yang berperan dalam mekanisme infeksi mastitis subklinis pada sapi perah.

MATERI DAN METODE

Penentuan hemaglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus*

Penentuan isolat *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang mempunyai hemaglutinin dilakukan dengan uji hemaglutinasi menggunakan 1% eritrosit sapi perah. Pengujian hemaglutinasi dilakukan dengan mencampur secara rata/homogen 50 ul suspensi bakteri yang sebelumnya telah disetarakan dengan BaSO₄ (mengandung 10⁸ sel bakteri/ml) dengan 50 µl 1% eritrosit sapi perah ke dalam mikroplate. Reaksi hemaglutinasi dapat dibaca setelah kontrol eritrosit mengendap. Reaksi dikatakan positif apabila terjadi aglutinat (penggumpalan) di dasar tabung dan negatif apabila terjadi endapan di dasar tabung seperti pada kontrol eritrosit (Beard, 1989).

Antibodi spesifik terhadap hemaglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus*

Hemaglutinin diperoleh dengan cara mencampur sebanyak 2 ml suspensi bakteri *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang menunjukkan uji hemaglutinasi positif dengan 2 ml *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 2%, diinkubasikan pada suhu kamar selama 60 menit, disentrifus 2.500 g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian didialisis menggunakan tabung membran (*membran tubing*) dan direndam dalam akuades dengan menggunakan *stirer*, selama 48 jam pada suhu 4°C. Untuk membersihkan sisa-sisa SDS akuades diganti 3 kali. Supernatan kemudian dicampur dengan eritrosit ayam dan diinkubasi pada suhu kamar selama 60 menit. Campuran disentrifus 2.500 g selama 5 menit dan dicuci PBS 3 kali. Produksi antibodi spesifik terhadap hemaglutinin diperoleh dengan cara

menyuntikkan secara intra vena hemaglutinin pada ayam yang sama (yang diambil eritrositnya) 3 kali seminggu selama 3 minggu berturut-turut. Serum dipanen 10 hari setelah penyuntikan terakhir dan spesifisitas antibodi diuji dengan imunodifusi *agar gel precipitation tests* (AGPT). Antibodi yang diperoleh ini digunakan untuk pembuatan matriks afinitas kromatografi.

Preparasi matriks afinitas kromatografi

Untuk keperluan isolasi hemaglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* perlu dibuat matriks afinitas kromatografi. Matriks aktif dibuat dengan mengaktifkan nitroselulose dengan *cyanogen bromide* (CN-Br) sebagai berikut: Potongan kertas nitroselulose 8X8 cm dimasukkan dalam *beaker glass* yang berisi larutan PBS 100 ml pada suhu 4°C kemudian ditambah CN-Br sedikit demi sedikit sebanyak 1 gram dan pH dijaga antara 11-13 selama 45-60 menit dengan penambahan NaOH pekat sambil digoyang-goyang. Cairan dibuang dan kertas dicuci dengan akuades dengan ulangan 6-8 kali. Kertas kemudian ditetesi dengan 5 ml antiserum terhadap hemaglutinin X *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang sudah dipreparasi (Wibawan *et al.*, 1997) pada *beaker glass* yang berbeda. Matriks yang sudah ditetesi antibodi kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Untuk menghilangkan antiserum yang tidak terikat oleh CN-Br kertas dicuci dengan PBS beberapa kali.

Isolasi hemaglutinin

Ekstrak hemaglutinin diisolasi dari *S. agalactiae* dan *S. aureus* yang ditumbuhkan pada 1000 ml *todd hewitt broth* (THB), diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Suspensi bakteri disentrifus dengan kecepatan 10.000 g, dicuci dengan PBS 3 X. Suspensi bakteri yang didapat diencerkan menjadi 10 ml dengan menambahkan PBS. Suspensi kemudian ditambah Lisosim 400 µl dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 60 menit, disentrifus dan diambil supernatnya. Supernatan diinkubasi pada matriks pada suhu 4°C selama 24 jam. Ikatan yang spesifik antara

matriks dengan hemaglutinin dielusi dengan menggunakan 2 ml 0,1 M glisin-HCl pada pH 2.5, kemudian dinetralisasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga pH 7.5

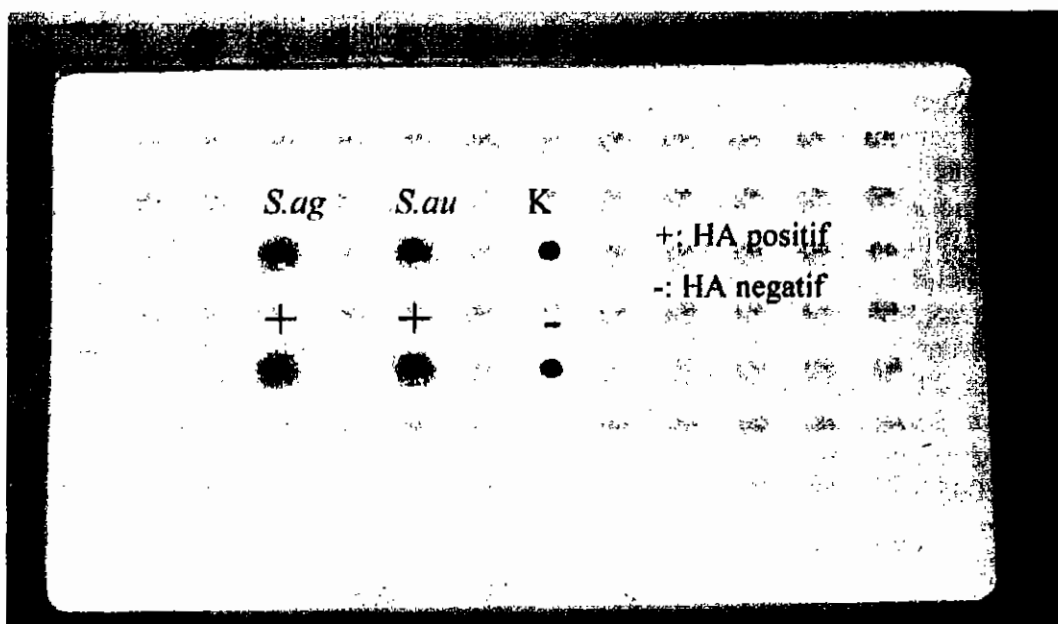
Analisis hemaglutinin

Hemaglutinin dipisahkan dengan SDS-PAGE 12,5%. *Separating gel* dibuat dengan komposisi dH₂O 3,3 ml; 30% Polyacrilamide 4 ml, 1.M Tris pH 8,8 2,5 ml, 10% SDS 100 ul, TEMED 10 ul dan 10% APS 90 ul. Setelah ditambah TEMED, larutan dicampur rata dan dituang ke dalam *sandwich plate* s/d 2-2,5 cm dari permukaan plate. *Stacking gel* 5% dipersiapkan dengan menggunakan tris pH 6,8 *Stacking gel*, isobutanol dibuang Setelah ditambahkan TEMED dalam *Stacking gel*, dituang kemudian dipasang sisir/*comb* diatas *separating gel* yg telah padat. Antigen hemaglutinin 20 µl ditambah 5 µl sampel *buffer* dididihkan 5-10 menit, kemudian dimasukkan dalam es dan sampel siap di *running*. Sampel kemudian dimasukkan dalam sumuran di *running* dengan 100 volt selama 1,5-2 jam. Setelah elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan *comassie blue* 0,1%. Pewarnaan dihentikan dengan *destaining buffer* sampai terlihat pita protein (Maniatis *et al.*, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas hemaglutinasi dari *S. agalactiae* dan *S. aureus* disajikan pada Gambar 1.

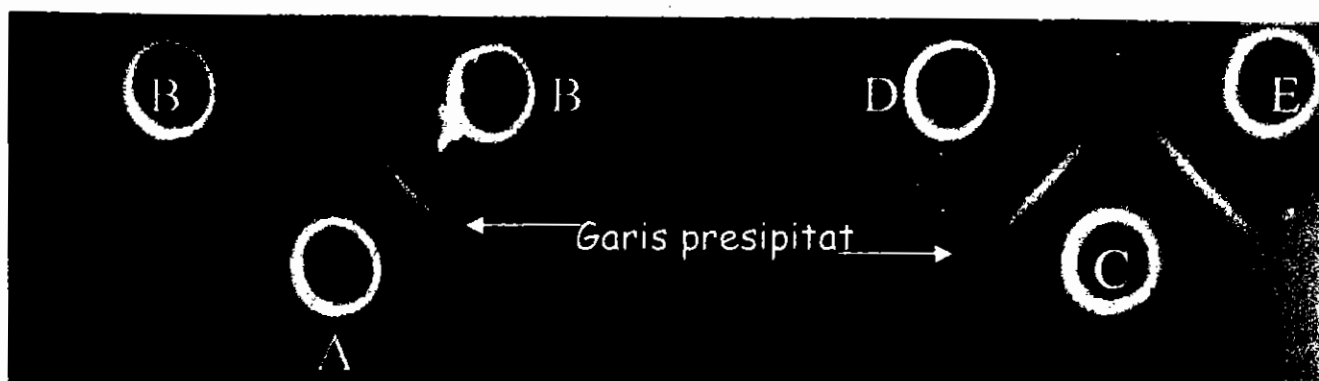
Kemampuan bakteri untuk menempel (*adesi*) pada sel inang diperantarai oleh komponen *adesin* bakteri yang membantu perlekatan bakteri pada reseptor spesifik dari sel inang. Kemampuan bakteri untuk menempel dan mengaglutinasi eritrosit dapat dipergunakan sebagai model sederhana untuk mempelajari reaksi antara bakteri dengan sel inang secara *in vitro* (Kurl *et al.*, 1989; Gottschalk *et al.*, 1990). *Adesin* merupakan struktur bakteri yang memperantarai *adesi*, sedangkan *adesin* yang mengaglutinasi eritrosit adalah hemaglutinin (Isaacson, 1985). Dari hasil



Gambar 1. Aktivitas hemaglutinasi *S. agalactiae* dan *S. aureus* dengan 1% eritrosit sapi perah
S.ag : *S. agalactiae* *S.au*: *S. aureus* K: kontrol

penelitian sebelumnya diketahui bahwa *S. agalactiae* yang mempunyai hemaglutinin mempunyai kemampuan menempel pada sel epitel ambing jauh lebih tinggi dibanding yang tidak memiliki hemaglutinin (Wahyuni, 1998). Demikian juga *S. aureus* yang memiliki hemaglutinin menempel pada sel epitel ambing jauh lebih tinggi dibanding yang tidak mempunyai (Abrar, 2001). Wibawan *et al.*, (1993) membuktikan bahwa streptococcus Grup B (SGB) yang mempunyai hemaglutinin

memiliki kemampuan menempel pada sel HeLa jauh lebih tinggi dibanding yang tidak memiliki hemaglutinin. Pada penelitian ini dilakukan isolasi hemaglutinin pada *S. agalactiae* dan *S. aureus*. Hemaglutinin diduga merupakan salah satu faktor virulen yang dimiliki oleh bakteri patogen dan bertanggung jawab dalam mekanisme infeksi. Hemaglutinin *S. saprophyticus* mempunyai peran yang penting dalam proses adhesi dan kolonisasi pada sel-sel ginjal hewan percobaan (Gunarson *et al.*, 1984;

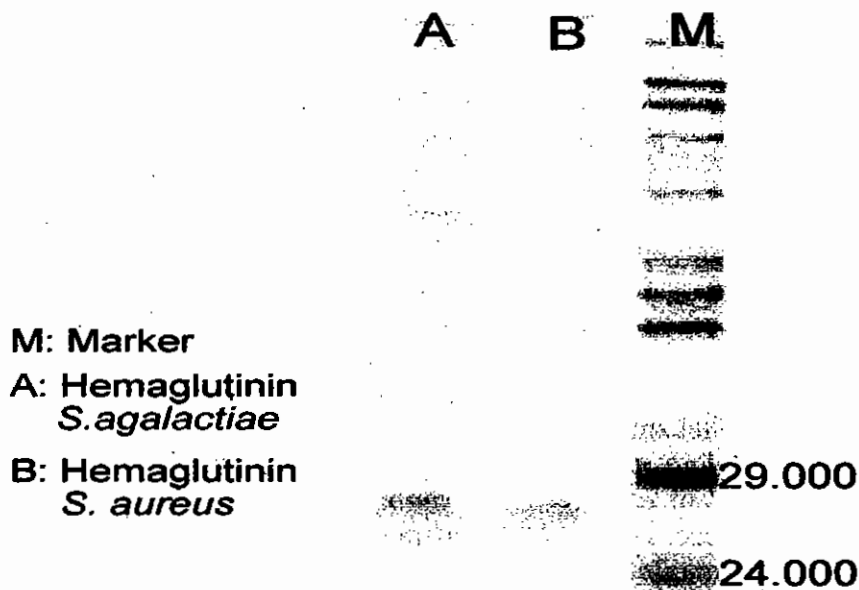


Gambar 2. Uji imunodifusi (AGPT) antara antibodi spesifik terhadap hemaglutinin dengan ekstrak hemaglutinin.
 A : Ekstrak hemaglutinin *S. agalactiae* C : Ekstrak hemaglutinin *S. aureus*
 B : Antibodi terhadap hemaglutinin *S. agalactiae* D : Antibodi terhadap hemaglutinin *S. aureus*

Beuth *et al.*, 1988, Gattermann *et al.*, 1992). Sampai saat ini penelitian tentang hemaglutinin pada *S. agalactiae* dan *S. aureus* masih sangat terbatas. Dari hasil penelitian Kurl *et al.*, (1989) dilaporkan hanya 1 isolat dari 30 isolat SGB asal manusia yang menunjukkan kemampuan hemaglutinasi. Hal ini sangat berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya dilaporkan 38% *S. agalactiae* dari mastitis subklinis mampu mengaglutinasi sel darah sapi perah (Wahyuni, 2004). Pada SGB isolat asal manusia keberadaan hemaglutinin mungkin tidak terekspresikan karena dilindungi oleh kapsul yang tebal (Wibawan *et al.*, 2005)

maupun gejala klinis yang muncul (Wibawan *et al.*, 1997). Lewat kemampuan adesi ini *S. agalactiae* dan *S. aureus* terbebas dari pengaruh pembasuhan organ-organ sekresi, sehingga terhindar dari efek basuh aliran susu.

Serum spesifik terhadap hemaglutinin diperoleh dengan cara menyuntik ayam dengan hemaglutinin yang telah ditempelkan pada permukaan eritrosit dari ayam yang sama. Ayam akan membentuk antibodi spesifik hanya terhadap hemaglutinin yang menempel pada permukaan eritrosit tetapi tidak terhadap eritrositnya sendiri. Antibodi terhadap hemaglutinin digunakan untuk deteksi



Gambar 3. Hasil elektroforesis hemaglutinin dengan SDS-PAGE

A: *S. agalactiae*, BM: 28 kDa

B: *S. aureus*, BM: 27 kDa

M: Marker

Bila dikaji dari kenyataan bahwa kedua bakteri ini diisolasi dari sapi penderita mastitis subklinis, maka keberadaan hemaglutinin sangat sesuai untuk sifat penyakit yang bersifat subklinis. Kemampuan menempel bakteri tampaknya lebih penting dari pada kemampuan invasi bakteri ke dalam jaringan dalam mekanisme infeksi. Sehingga tidak dijumpai perubahan yang berarti pada jaringan ambing

hemaglutinin menggunakan matriks nitroselulose dengan teknik afinitas kromatografi. Hemaglutinin yang dihasilkan ternyata bereaksi spesifik terhadap antibodi hemaglutinin masing-masing dan tidak bereaksi silang antara ke duanya. Serum spesifik terhadap hemaglutinin ini selanjutnya digunakan untuk mengaktifkan matriks nitroselulose yang sebelumnya sudah

diaktifkan dengan *Cyanogen bromide* (CN-Br), yang selanjutnya matriks ini digunakan untuk mengisolasi hemagglutinin dari permukaan sel *S. agalactiae* dan *S. aureus*. Hemagglutinin yang telah terisolasi ini ternyata bereaksi spesifik dengan serum terhadap hemagglutinin pada uji imunodifusi (Gambar 2).

Serum yang dipanen menunjukkan reaksi spesifik terhadap ekstrak bakteri yang memiliki hemagglutinin pada uji imunodifusi (AGPT). Serum spesifik ini tidak menunjukkan reaksi dengan ekstrak bakteri yang tidak memiliki hemagglutinin. Demikian juga serum spesifik terhadap hemagglutinin *S. agalactiae* tidak bereaksi dengan ekstrak hemagglutinin *S. aureus* dan sebaliknya. Dari sini tampak bahwa reseptor hemagglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* adalah berbeda. Jadi antibodi terhadap hemagglutinin *S. agalactiae* hanya spesifik untuk hemagglutinin *S. agalactiae* dan demikian sebaliknya.

Dengan teknik afinitas kromatografi dapat diisolasi *S. agalactiae* dan *S. aureus*. Pemisahan hemagglutinin dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa hemagglutinin hanya memiliki satu pita protein dengan berat molekul 28 kDa untuk *S. agalactiae* dan 27 kDa pada *S. aureus* (Gambar 3). Hal ini berbeda dengan berat molekul hemagglutinin sebelumnya pada *S. agalactiae* yaitu 43 kDa (Wibawan *et al.*, 1997) dan 46 kDa pada *S. aureus* (Abrar, 2001). Berat molekul hemagglutinin pada *S. saprophyticus* ternyata mempunyai berat molekul 160 kDa (Gunarson *et al.*, 1984; Gatterman *et al.*, 1992).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hemagglutinin *S. agalactiae* dan *S. aureus* dapat ditentukan dengan uji hemagglutinasasi. Dengan teknik afinitas kromatografi dapat diisolasi hemagglutinin dari *S. agalactiae* dan *S. aureus* dengan SDS-PAGE diketahui 1 pita protein dengan berat molekul 28 kDa untuk *S. agalactiae* dan 27 kDa untuk *S. aureus*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementrian Riset an Teknologi

(Menristek) yang telah memberi dana penelitian Riset Unggulan Terpadu (RUT) XI/1 tahun 2004.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M. 2001. Isolasi, Karakterisasi dan Aktivitas Biologi Hemagglutinin *Staphylococcus aureus* dalam Proses Adhesi pada Permukaan Sel Epitel Ambing Sapi Perah. Disertasi Pascasarjana, FKH-IPB, Bogor
- Beard, C.W. 1989. Influenza. In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3d ed. H.G. Purchase., eds., Kennett Square, PA: American Association Avian Pathologists, Pp. 192-200. Lib. Cong. Cat. Card No. 89-80620
- Benda, P.M. Vylet"elov" and A. Tich'a"cek. 1997. A method for Estimating the Prevalence of Mammary *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* Infection in Herds Based on an Examination of Bulk Milk samples. *Journal Veterinary Medicine (Praha)*. 42:101- 109
- Beuth, J., Ko, H.I., Perdreau, F.S., Peters, G., Heczko, P. and Pulveler, G. 1988. Hemagglutination by *Staphylococcus saprophyticus* and other Coagulase-negative Staphylococci. *Microbiol. Path.* 4: 379-383
- Gattermann, S., Meyer, H.G.W. and Wanner, G. 1992. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infect. Immun.* 60: 4127-4132.
- Gottschalk, M., Lebrun, A., Jacquest, M. and Higgins, R. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococci suis*. *J Clin. Microbiol.* 28: 2156-2158.

- Gravekamp, C., Kasper, D.L., Michel, J.L., Kling, D.E., Carey, V. and Madoff, L.C. 1997. Immunogenicity and Protective Efficacy on the Alpha C Protein of Group B Streptococci are Inversely Related to the Number of Repeats. *Infect. Immun.* 65: 5216-5221
- Gunarson, A., Mardh, P.A., Lunblad, A. and Svensson, S. 1984. Oligosaccharide structures mediating agglutination of sheep erythrocytes by *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* 45:41-46.
- Isaacson, R.E. 1985. Pilus Adhesin in: Savage, D.C and Fletcher, M (Ed). Bacterial Adhesin Mechanism and Physiological Significance. 307-336. Plenum Publishing Corp. New York
- Kurl, D.N., Haataja, S. and Finne, J. 1989. Hemagglutination Activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 57: 384-389.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: a Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Ofek, I., Kahane, I. and Sharon, N. 1996. Toward anti adhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* 4: 297-299.
- Sudarwanto, M., Sanjaya, W. dan Purnawarman T. 1992. Residu Antibiotika dalam Susu Pasteurisasi ditinjau dari Kesehatan Masyarakat. Dalam jurnal Ilmu Pertanian Indonesia Vol. 2, No.1, Maret 1992
- Sudarwanto, M. 1999. Usaha Peningkatan Produksi Susu Melalui Program Pengendalian Mastitis Subklinis. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Masyarakat Veteriner, Bogor 22 Mei 1999. FKH-IPB.
- Wahyuni, A.E.T.H., 2004. The Role of Hemagglutinin of *Streptococcus agalactiae* in Adhesion of Udder Epithelial Cells in Dairy Cattle. *Jurnal Gakuryoku*, Vol X, No2, Th. 2004
- Wahyuni, A.E.T.H., Khurniawati, F., Purnomo B., I. Ramadhani dan I W.T. Wibawan. 2001. Distribusi serotipe *Streptococcus agalactiae* Penyebab Mastitis Subklinis pada Sapi Perah di Jawa. *Konggres Nasional Bersama (PETRI Vii, PERPARI IV, PERMI VIII, PKWI IV)*. Yogyakarta 11-15 Juli 2001
- Wahyuni, A.E.T.H., 1998. Peran Hemagglutinin *Streptococcus agalactiae* dalam Proses Adesi pada Sel Epitel Ambing Sapi Perah. Tesis Pascasarjana, FKH-IPB, Bogor
- Wibawan, I.W.T., Harlina, E., Chandramaya Siska Damayanti dan Zarkazie, K. 2005. Preparasi Antiserum Terhadap Hemagglutinin *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* serta Perannya sebagai Anti Adesin dan Opsonin.
- Wibawan, I.W.T. 1998. The Possibility of Using Vaccine to Control Bovine Subclinical Mastitis and Human Neonatal Infection Caused by Group B Streptococci. *Media Veteriner* 5:1-6
- Wibawan, I.W.T., Pasaribu F.H., H. Huminto, dan Estuningsih S. 1997. Ciri Biovar *Streptococcus agalactiae* sebagai Petunjuk Reaksi Silang antara Sapi dan Manusia. Laporan Hibah Bersaing IV
- Wibawan, I.W.T., Laemmler Ch., Seleim R.S. and Pasaribu F.H. 1993. A hemagglutinating adhesin of group B Streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates an adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2173-2178
- Wizeman, T.M., Andamou, J.E. and Langermann, S. Adhesins as Targets for Vaccine Development. <http://www>.

Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni, I Wayan Teguh Wibawan, Michael Haryadi, Karakterisasi Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* Penyebab Mastitis Subklinis Pada Sapi Perah

cdc.gov/neiidod/eid/vol5no3/wizeman.htm. (October 6, 2000).