

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK *Streptococcus agalactiae* PENYEBAB MASTITIS SUBKLINIS PADA SAPI PERAH MENGGUNAKAN PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

GENETIC ANALYSIS OF *Streptococcus agalactiae* CAUSED SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY CATTLE BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni

Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Streptococcus agalactiae atau Streptokokus grup B (SGB) adalah salah satu bakteri utama penyebab mastitis subklinis pada sapi perah dan merupakan parasit obligat pada ambing. Karakterisasi *S. agalactiae* biasanya dilakukan secara konvensional menggunakan metode *serotyping*. Meski metode ini sering digunakan namun masih mempunyai kelemahan apalagi masih adanya isolat *S. agalactiae* yang belum dapat dimasukkan ke dalam serotipe yang ada (nontypeable/NT), oleh karena itu pendekatan baru dengan metode *genotyping* digunakan. Tujuan dari penelitian ini adalah melihat profil DNA menggunakan PFGE dan kekerabatan isolat dari masing-masing serotipe maupun masing-masing daerah. Penentuan serotipe *S. agalactiae* dilakukan dengan metode *serotyping* menggunakan antiserum spesifik terhadap 9 serotipe *S. agalactiae* dengan uji imunodifusi/ agar gel presipitasi (AGP). Analisa genotipe *S. agalactiae* dilakukan menggunakan *macro restriction fragment length polymorphism* (MLFP)/ metode *schizotyping* menggunakan *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Hasil dari penelitian ini adalah genotipe dari *S. agalactiae* dengan enzim restriksi *SmaI* dihasilkan potongan-potongan pita *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) yang jelas. Ada 3 isolat *S. agalactiae* yang tidak dapat dipotong oleh enzim restriksi *SmaI*. Analisa DNA genom dari 21 isolat *S. agalactiae* dihasilkan 15 profil DNA.

Kata kunci: mastitis subklinis, *Streptococcus agalactiae*, PFGE

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is one of the main agents responsible for subclinical mastitis in dairy cattle and as an obligate parasite in udder. Characterization of *S. agalactiae* usually done by conventional serotyping method. Although this method is often used but actually the method had lack of a sufficiently discriminatory typing system and the existence of nontypeable (NT), therefore a new approach by genotyping used. The aims of this research were to know the profile of DNA *S. agalactiae* and the genetic relationship between isolates. Determination of serotype of group *S. agalactiae* was done by serotyping method using specific antiserum to *S. agalactiae* in immunodiffusion assay/ Agar Gel Precipitation Test (AGPT). The genotypic of the bacteria was done by macro restriction fragment length polymorphism (MFLP)/ *schizotyping* method using Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Results of the present study showed that genotypic of *S. agalactiae* with *SmaI* restriction enzyme produced Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) discrete fragments. There were 3 isolates of *S. agalactiae* that could not be restricted by *SmaI* enzyme. Genomic DNA analysis of 21 isolates showed 15 different DNA profiles.

Key words: subclinical mastitis, *Streptococcus agalactiae*, PFGE

PENDAHULUAN

Kejadian mastitis sekitar 97-98% merupakan mastitis subklinis, sedangkan 2-3% merupakan kasus mastitis klinis yang terdeteksi (Sudarwanto, 1999). Menurut Wibawan *et al.* (1995) dan Wahyuni (2002) kejadian mastitis subklinis di Jawa sangat tinggi (kurang lebih 85%). Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, 67% di pulau Jawa (Hirst *et al.*, 1984); 61,66% di Jawa Barat (Sudarwanto *et al.*, 1984) dan lebih dari 80% sapi perah di DKI Jakarta (Sudarwanto dkk., 1987) dan antara tahun 1989 sampai 1996 diperoleh 80-90% di Jawa dan di Bogor sekitarnya 80-87% (Ananto, 1995; Sukada, 1996; Sudarwanto, 1999).

Dari hasil penelitian Wibawan *et al.* (1995) terisolasi *Streptococcus agalactiae* pada kejadian mastitis subklinis sebesar 83% di wilayah Bogor, 82% untuk wilayah Boyolali dan sebesar 80% untuk wilayah Malang. Sedang Benda *et al.* (1997) mengatakan bahwa dua bakteri patogen penyebab mastitis yang sering ditemukan yaitu *S. agalactiae* (92%) dan *Staphylococcus aureus* (67%). Dari hasil penelitian Wahyuni (2002) *S. agalactiae* sebagai penyebab mastitis subklinis di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur sebesar 29%. *Streptococcus agalactiae* merupakan parasit obligat pada ambing sapi perah (Kennedy, 1970).

Karakterisasi bakteri ini secara konvensional dilakukan dengan metode serotyping. Berdasarkan spesifisitas antigen permukaan *S. agalactiae* ada beberapa serotipe yaitu yang memiliki antigen polisakarida yang sampai saat ini ada 9 serotipe yaitu Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII dan yang memiliki antigen protein yaitu c, R, X (Gravekam *et al.*, 1999; Bushman 1998; Kogan *et al.*, 1996). Menurut Wibawan dan Laemmler (1990) isolat *S. agalactiae* dapat memiliki serotipe dengan antigen polisakarida baik berdiri sendiri maupun dalam bentuk kombinasi dengan antigen protein, misalnya Ia/c, II/X. Namun demikian ada isolat yang belum bisa diklasifikasikan kedalam serotipe *nontypeable* (NT). Meski metode ini sering dipakai, namun

sebetulnya mempunyai kelemahan dalam membedakan bakteri secara lebih diskriminatif/rinci, apalagi masih banyak isolat *S. agalactiae* dari sapi yang termasuk kelompok NT (Blumberg *et al.*, 1992; Fasola *et al.*, 1993; Limansky *et al.*, 1998). Akhir-akhir ini pendekatan secara molekuler bertujuan untuk mengetahui perbedaan genom diantara organisme yang sangat dekat telah digunakan untuk karakterisasi *S. agalactiae* yaitu dengan *restriction enzyme fragment length polymorphism* (RLFP), *ribotyping*, *Multi locus enzyme electrophoresis* dan *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (Blumberg *et al.*, 1996; Blumberg *et al.*, 1992; Denning *et al.*, 1989; Fasola *et al.*, 1993; Bentley dan Leigh, 1995; Gordillo *et al.*, 1993; Quentin *et al.*, 1995). Sifat ekspresi genotipe dari bakteri dapat dilihat dari profil DNA genom dengan metode *schizotyping*. Metode ini didasarkan pada teknologi pemisahan potongan DNA yang berukuran besar, dengan menggunakan elektroforesis gel medan berpulsa (*pulsed-field gel electrophoresis*)/PFGE (Suwanto, 1994). *Schizotyping* merupakan analisis total DNA genom, dengan cara melihat pola pita DNA yang dihasilkan setelah DNA genom itu dipotong dengan enzim restriksi dengan situs pemotongan yang jarang dan dipisahkan dengan PFGE.

Meski kejadian mastitis subklinis pada sapi perah yang disebabkan oleh *S. agalactiae* di Indonesia tinggi, namun penelitian mengenai *S. agalactiae* sebagai penyebab penyakit mastitis masih sedikit dilakukan apalagi profil DNA dari bakteri tersebut belum dilaporkan. Oleh karena itu penelitian analisis genetik berdasar PFGE perlu dilakukan.

Tujuan dari penelitian ini adalah melihat profil DNA menggunakan PFGE dan kekerabatan isolat dari masing-masing serotipe maupun masing-masing daerah.

MATERI DAN METODE

Sebanyak 21 isolat *S. agalactiae* yang terdiri dari 6 isolat dari Bogor dengan serotipe (NT, II/c, II/X, II, NT/R, II/R); Boyolali 5 isolat (NT, V, V/c, V/c/X, NT/X) dan Malang 5

isolat (II/X, NT, II/X, NT, NT/X) serta 5 isolat rujukan yang merupakan isolat rujukan internasional (*International Referens Strain*) yaitu : tipe Ia (A 909), Ib (H 36 B), c (A 909), II (18 RS-21), III (6313), IV (3139), V (SS 1169), VI (NT 6), VII (7271), VIII (JM9-130013), R (24/60) dan X (25/60) digunakan dalam penelitian ini. Seluruh isolat dibiakkan dalam 10 ml *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi selama 18-24 jam, pada suhu 37°C. Biakan kemudian disentrifus 5.000 rpm selama 30-60 detik, pelet kemudian ditambah 2 ml PIV buffer (1M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,6) disentrifus lagi, dan disimpan pada suhu 4°C atau langsung dipergunakan untuk penyiapan DNA genom utuh.

Suspensi bakteri sebanyak 1 ml dihangatkan pada suhu 37°C kemudian ditambah dengan 1 ml *low melting point agarose* 1,6% (LMA 1,6%) dalam air hangat. Campuran kemudian dituang dalam cetakan *agar plug* (20X10X1mm) kemudian dibekukan pada suhu 4°C selama 10 menit. Blok agarose kemudian direndam dalam 10 ml larutan buffer EC (6 mM Tris HCl pH 7,6, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 7, 0,5% Brij 58, 0,2% deoxycholate, 0,5% *sodium lauryl sarcosine*, 20 µg RNase per ml, 1 mg lisozim per ml) dan diinkubasi selama 18 jam, 37°C dengan pengocokan lemah dalam inkubator bergoyang/*shaker* (60 rpm). Setelah itu larutan EC diganti dengan larutan ESP (0,5 mM EDTA [pH 9-9,5], 0,5 *sodium lauryl sarcosine*, 50 µg proteinase K per ml) dan diinkubasi (48 jam, 56°C) dalam *shaker* (80 rpm). Blok agarose kemudian dicuci 3 X dengan 10 ml TE (10mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 mM EDTA) dan blok agarose yang telah mengandung DNA utuh (*gel insert/gel plug*) ini disimpan dalam buffer TE pada suhu 4°C untuk digunakan selanjutnya.

DNA genom utuh dalam gel (*gel insert*) dipotong-potong 1-2 mm kedalam tabung *Eppendorf* dan ditambahkan 200 µl H₂O dan 2 µl *SmaI* serta 25 µl buffer reaksi untuk 12-24 jam, 37°C. Potongan gel kemudian dicuci dengan 1 ml TE minimal 1 jam, 37°C. *Gel insert* yang telah direstriksi dengan enzim

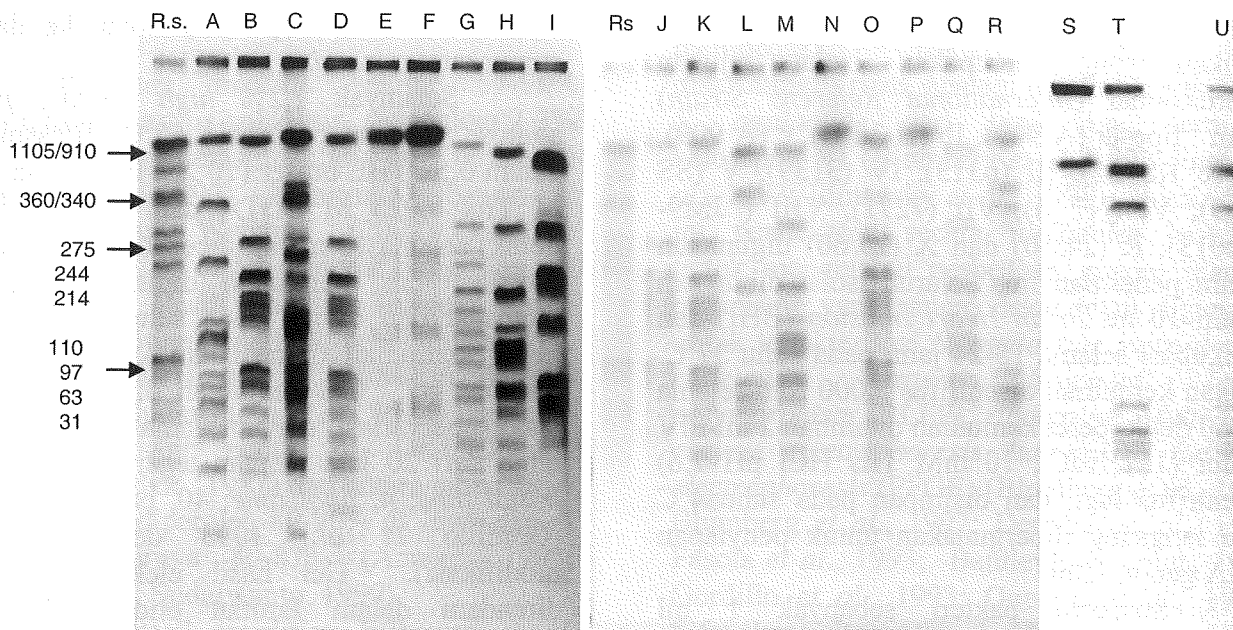
endonuklease ini siap dimasukkan ke dalam sumur-sumur *running gel* PFGE

Sebanyak 1,2% *high melting point* agarose dengan titik cair 65°C dimasukkan dalam 0,5x TBE buffer (10 X TBE adalah 0,89 M Tris 0,025 M EDTA dan 0,89 M asam borak) selama 10 menit, dicetak dalam cetakan 20x10x1 cm, kemudian didiamkan sampai memadat dan dingin pada suhu ruang. Gel insert kemudian dimasukkan kedalam sumur *running gel*. Gel kemudian diproses dengan waktu bervariasi dengan lama elektroforesis lebih dari 20 jam dengan tegangan 175 volt, *initial time*: 4, *final time*: 40, pada suhu 14°C (Gordillo *et al.*, 1993 dengan sedikit modifikasi). Gel hasil elektroforesis ini direndam dalam larutan etidium bromida (1µg/ml) selama 10 menit kemudian direndam dalam akuades selama 20-30 menit. Gel hasil elektroforesis selanjutnya diamati dengan UV-transilluminator ($\lambda = 280$ nm).

Dokumentasi hasil dilakukan dengan menggunakan *Gel-Doc*. Ukuran fragmen DNA ditentukan dengan membandingkan ukuran DNA standar. Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Perbedaan antar isolat ditunjukkan oleh adanya jumlah pita dan jarak migrasinya. Fenogram dan pohon filogenetik dikonstruksi dengan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan program komputer *Numerical Taxonomy System* (NTSYS-pc) *version 1.60 programs* (Rohlf, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Genotipe suatu sel ditentukan oleh informasi genetik yang dikandung di dalam kromosomnya. Bakteri seperti halnya sel-sel organisme tingkat tinggi membawa lebih banyak informasi genetik/genotipenya dari pada yang dipergunakan atau yang diekspresikannya. Bila suatu ciri-ciri itu masih dinyatakan dalam perangkat genetik maka ciri-ciri tersebut disebut genotipe. Genotipe *S. agalactiae* dari Bogor, Boyolali dan Malang dapat dilihat dengan profile DNA genom hasil PFGE yang didasarkan jumlah pita dan jarak migrasi. Hasil dari genotipe *S. agalactiae* dari Bogor,



Gambar 1. Pita DNA genom isolat *S. agalactiae* berasal dari Bogor, Boyolali dan Malang dengan enzim restriksi *SmaI* dengan PFGE.
A – U : kode isolat *S. agalactiae* R.s : *Rhodobacter spheroides* 2.4.1(marker)

Boyolali dan Malang secara lengkap ditunjukkan pada Gambar 1.

Dari 21 isolat yang diuji tampak DNA terestriksi oleh enzim *SmaI* dengan jelas. Pola yang dihasilkan dari masing-masing isolat khas dan unik sehingga merupakan sidik jari dari masing-masing isolat. Bakteri streptokokus mengandung mol G+C 34% (Timoney *et al.*, 1988). Sedang strategi yang disarankan oleh McClelland *et al.* (1987) adalah bahwa genom dengan kandungan G+C < 40% cocok menggunakan enzim endonuklease yang mengenal situs yang kaya G+C. Dengan situs pemotongan enzim restriksi yang mengenali sekuen yang kaya molekul G+C diharapkan dapat memotong jarang DNA genom bakteri *S. agalactiae* ini. Enzim restriksi *SmaI* yang dipakai dalam penelitian ini adalah enzim yang mengenali sekuen kaya G+C yang memiliki spesifikasi enam pasang basa dengan situs pemotongan *SmaI* (CCC ↓ GGG). Semakin panjang jumlah basa yang dikenali enzim restriksi maka semakin sedikit situs yang dikenalnya pada DNA genom sehingga semakin sedikit fragmen-fragmen DNA genom yang dihasilkan. Menurut Suwanto dan Kaplan

(1992) enzim yang digunakan untuk MFLP/*shizotyping* harus memotong jarang sehingga menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang berukuran besar dengan jumlah sedikit. Oleh karena itu MFLP ini cocok menggunakan enzim *SmaI*. Pemakaian enzim restriksi *SmaI* telah dilakukan pada bakteri streptokokus oleh Gordillo *et al.* (1993) untuk bakteri SGB dan menghasilkan potongan DNA yang diskrit. Pemakaian enzim *SmaI* untuk restriksi juga telah dilakukan juga oleh Chaussee *et al.* (1996) pada *Streptococcus pyogenes*, dan menghasilkan potongan DNA yang jelas. Namun demikian pada penelitian ini ada 3 isolat yang tidak dapat dipotong dengan enzim *SmaI* yaitu isolat P (B-107/NT/X) dan isolat N (M-88/NT) serta isolat S (R.ref). Dari hasil ini tampak bahwa tidak semua isolat *S. agalactiae* dapat dipotong dengan enzim *SmaI*. Peneliti sebelumnya Gordillo *et al.* (1993) yang mengatakan bahwa ada isolat-isolat *S. agalactiae* ternyata tidak dapat dipotong enzim *SmaI* namun belum diketahui secara pasti apa yang menyebabkannya.

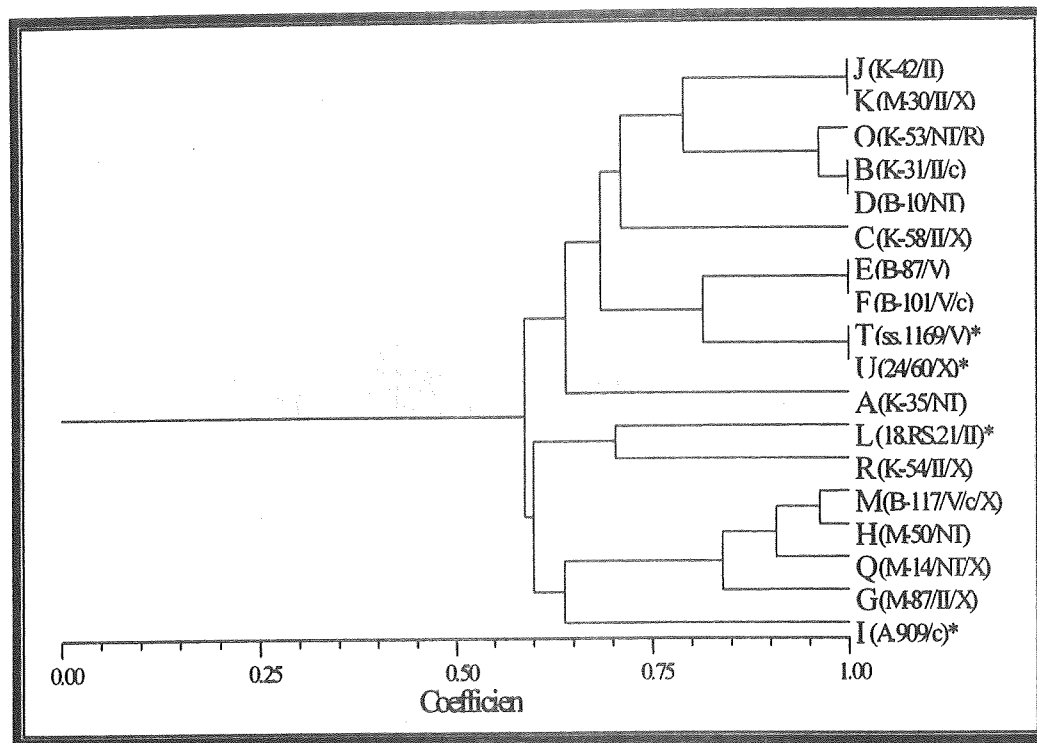
Jumlah pita DNA pada penelitian ini berkisar antara 7 sampai 15 dengan besar

Tabel. 1. Serotipe, Jumlah Pita DNA dan Pola PFGE *S. agalactiae* dengan enzim restriksi *SmaI* asal Bogor, Boyolali dan Malang

No	Kode Isolat	Asal	Serotipe	Jumlah pita	Pola PFGE
1.	A (K-35)	Bogor	NT	12	A
2.	B (K-31)	Bogor	II/c	13	B*
3.	C (K-58)	Bogor	II/X	15	C
4.	D (B-10)	Boyolali	NT	13	B*
5.	E (B-87)	Boyolali	V	9	E@
6.	F (B-101)	Boyolali	V/c	9	E@
7.	G (M-87)	Malang	II/X	15	G
8.	H (M-50)	Malang	NT	11	H
9.	I (A.909)	Rujukan	C	11	R
10.	J (K-42)	Bogor	II	13	J
11.	K (M-30)	Malang	II/X	13	K
12.	L(18.RS.21)	Rujukan	II	8	L
13.	M (B-117)	Boyolali	V/c/X	11	M
14.	N (M-88)	Malang	NT	-	N#
15.	O (K-53)	Bogor	NT/R	13	O
16.	P (B-107)	Boyolali	NT/X	-	N#
17.	Q (M-14)	Malang	NT/X	10	Q
18.	R (K-54)	Bogor	Ii/x	10	R
19.	S (25/60)	Rujukan	R	-	n#-
20.	T (ss.1169)	Rujukan	V	7	t^
21.	U (24/60)	Rujukan	X	7	t^
22.	X R.s.2.4.1)	Marker	-	12	.

molekul <31 sampai 910/1105 kb. Analisa DNA dari 21 isolat *S. agalactiae* dihasilkan 15 pola profile DNA. Profile DNA disini dapat digunakan sebagai sidik jari dari masing-masing isolat. Pola pita DNA pada Gambar 1 diatas selanjutnya diinterpretasikan menjadi matrik data biner (0 dan 1) berdasar muncul tidaknya potongan DNA Jika pita muncul maka diberi skor 1 dan bila tidak muncul diberi skor 0, kemudian dikonversikan menjadi matriks data kesamaan. Matriks data kesamaan dikelompokkan menggunakan metode *Unweighted pair-group method arithmetic average* (UPGMA) menggunakan Program NTSYS-PC Version 1.60 (Rohlf, 1990) sehingga didapatkan dendrogram hubungan kekerabatan antara satu isolat dengan isolat yang lain baik antar serotipe maupun antar wilayah seperti pada Gambar 2. Pola profile DNA *S. agalactiae* yang dipotong dengan enzim *SmaI* dapat dilihat pada Tabel. 1

Berdasarkan data matrik hasil *schizotyping* yang dikelompokkan menggunakan UPGMA, dari ke 21 isolat yang dipotong dengan enzim *SmaI* (3 isolat tidak terpotong) tersebut dapat digolongkan menyadi 2 kelompok besar. Kelompok pertama yaitu isolat J, K, O, B, D, C, E, F, T, U dan A. Sedang kelompok kedua terdiri dari isolat L, R, M, H, Q, G dan J. Namun setelah ditelusuri lebih lanjut kelompok pertama ternyata berasal dari daerah yang berbeda-beda, demikian pula kelompok kedua ternyata berasal dari daerah yang berbeda-beda. Jadi dari asal isolat tidak ada hubungan secara langsung dengan genotipe isolat. Pengamatan selanjutnya berdasar serotipe isolat memperlihatkan bahwa kelompok pertama juga berasal dari bermacam-macam serotipe, demikian juga dengan kelompok kedua. Jadi serotipe isolat *S. agalactiae* disini tidak mempengaruhi langsung terhadap ekspresi genotipe.



Gambar 2. Dendrogram yang menunjukkan hubungan kekerabatan antar isolat *S. agalactiae* asal Bogor, Boyolali dan Malang dengan berbagai serotipe.

Dari hasil dendrogram tampak ada isolat-isolat mempunyai kekerabatan yang dekat yaitu antara isolat J (K-42/ II) dan isolat K (M-30/ II/X), isolat B (K-31/ II/c) dan D (B-10/NT), isolat E (B-87/ V) dan F (B-101/ V/c) serta isolat T (V.ref) dan U (X.ref). Tingkat kekerabatan di sini 100% menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut mempunyai kekerabatan yang sangat dekat. Isolat-isolat tersebut ternyata bukan berasal dari wilayah yang sama dan juga bukan merupakan isolat dengan serotipe yang sama. Jadi isolat yang berasal dari wilayah yang sama ataupun isolat dengan serotipe yang sama belum tentu memiliki profil DNA yang sama, demikian juga sebaliknya. Selain itu isolat yang lain mempunyai kekerabatan yang sangat beragam, misalnya isolat M (B-117)/c/X) dengan H (M-50/NT) mempunyai kekerabatan yang dekat yaitu sekitar 95%. Sedang isolat yang lain tingkat kekerabatannya sangat beragam. Jadi dari analisis secara genotipe asal isolat maupun perbedaan serotipe dari *S. agalactiae* ini tidak memiliki korelasi.

Keanekaragaman dalam spesies menyebabkan pada tiap anggota spesies dapat dilihat adanya kedekatan kekerabatannya satu sama lain. Semakin banyak persamaan ciri-ciri yang dimiliki semakin dekat kekerabatannya. Sebaliknya semakin sedikit persamaan yang dimiliki makin jauh kekerabatannya. Faktor penentu timbulnya keanekaragaman genetik yang berakibat pada timbulnya keanekaragaman dalam kehidupan adalah adanya mutasi gen. Mutasi dalam gen ini merupakan faktor penentu timbulnya keanekaragaman genetik yang berakibat pada timbulnya keanekaragaman dalam kehidupan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada *Indonesia Toray Science Foundation (ITSF)* 8 tahun 2002 yang telah memberikan dana sehingga penelitian ini berjalan lancar. Ucapan terima kasih pula penulis sampaikan kepada Kepala Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor serta Direktur SEAMEO

BIOTROP yang telah mengizinkan dan memberi kesempatan sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar. Kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, MSc. yang telah memberi kesempatan dan memberi masukan penulis ucapkan terimakasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Ananto, D. 1995. *Prevalensi Mastitis Subklinis Beberapa Kecamatan di Kabupaten Dati II Bogor dengan Menggunakan Pereaksi IPB-1 dan BREED*, Skripsi FKH-IPB.
- Benda, P.M., Vylet'elov'', Tich'a''cek A. 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. *J. Vet. Med. (Praha)*. 42:101-109.
- Bentley, R.W., Leigh J.A. 1995. Determination of 16S Ribosomal RNA Gene Copy Number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, dan *S. parauberis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:1-8.
- Bhushman, R., Anthony, B.F., Frasch C.E. 1998. *Estimation of Group B Streptococci Type III Polysaccharide Specific Antibody*.
- Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Licitra, C. 1992. Molecular Epidemiology Of Group B Streptococcal Infections: Use of Restriction Endonuclease Analysis of Chromosomal DNA and Restriction Fragment Length polymorphisms of Ribosomal RNA genes (Ribotyping). *J. Infect. Dis.* 166:574-579.
- Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Modansky, M., Erwin, M., Elliot, J., Facklam, R.R., Schchat, A., Baughman, W., Farley, M.M. 1996. Invasive Group B Streptococcal Diseases: The Emergence of Serotype V. *J. Infect. Dis.* 173:365-373.
- Chausse, M.S., Liu, J., Stevens, D.L., Ferretti, J.J. 1996. Genetic and Phenotypic Diversity among Isolates of *Streptococcus pyogenes* from Invasive Infections. *Infect. Dis.* 173:901-908.
- Denning, D.W., Baker, C.J., Troup, N.J., Tomkins, L.S. 1989. Restriction Endonuclease Analysis of Human and Bovine Group B Streptococci for Epidemiologic Study. *J. Clin. Microbiol.* 27:1352-1356.
- Fasola, F., Lindahl, C., Ferrieri, P. 1993. Molecular Analysis of Multiple Isolates of the Major Serotypes of Group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 31:2616-2620.
- Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C.J., Murray, B.E. 1993. Typing of group B streptococci: comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1430-1434.
- Gravekamp, C., Dennis, L.K., Lawrence, C.P. 1999. Alpha c protein as a Carrier for Type III Capsular Polysaccharide and as a Protective Protein in Group B Streptococcal Vaccines. *Infect Immun.* 67:2491-2496.
- Hirst, R.G., Rompis A., Sudarwanto, M., Nurhadi, A., Emmins, J.J. 1984. *Subclinical Mastitis as a cause of milk Production losses in Indonesia*. Milk 7412 Production in Developing Countries Conference, 2-6 April 1984, Eidenburg.
- Kennedy, K.P. 1970. *Pathology of Domestic Animals*. 2nd Ed. Academic Press. New York and London.

- Kogan, G., Uhrin, D., Brisson J.R., Paoletti, L.C., Blodgett, A.E., Kasper, D.L., Jennings, H.J. 1996. Structural and Immunochemical Characterization of type VIII Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide. *J. Biol. Chem.* 271:8786-8790.
- Limansky, A.S., Emma, G.S., Maria, C.G., Ines, E.T., Alejandro, M.V. 1998. Genomic Diversity among *Streptococcus agalactiae* Isolates Detected by a Degenerate Olygonucleotida-Primed Amplification Assay. *J. Infect. Dis.* 177:1308-1313.
- McClelland, M., Jones, R., Patel, Y., Nelson, M. 1987. Restriction Endonuclease for Pulsed Field Mapping of Bacterial Genomes. *Nucleic Acids Res.* 15:5985-6005.
- Quentin, R., Huet, H., Wang, F.S., Geslin, P., Goudeau, A., Selander, R.K. 1995. Characterization of *Streptococcus agalactiae* Strains by Multilocus Enzyme Genotype and Serotype: Identification of Multiple Virulent Clone Families that Cause Invasive Neonatal Disease. *J. Clin. Microbiol.* 33:2576-2581.
- Rohlf, F.J. 1990. NT-Sys-pc, *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.60*. Exeter Software, New York.
- 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.
- Sudarwanto, M., Sanjaya, W., Soejoedono, R., Siregar, A., Rumawas, I., Yuwono, B.S. 1984. *Gambaran Kasus Mastitis di Kabupaten Bogor, Cianjur dan Sukabumi Berdasarkan Perhitungan Jumlah Sel Radang dengan Menggunakan Metode BREED*. Pertemuan Ilmiah Konggres PDHI ke IX, Bandung, 1984.
- Sudarwanto, M., Rumawas, I.; Soejoedono, R., Sanjaya, W. 1987. *Residu Antibiotika yang dapat Mengganggu Kesehatan Manusia*. Laporan Survei di Jakarta.
- Sukada, I.M. 1996. *Kejadian Mastitis Subklinis oleh Streptococcus agalactiae di Daerah Semplak Bogor dan Pengaruhnya terhadap Kualitas Susu*. [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Program Pascasarjana.
- Suwanto, A. 1994. Pulsed field gel electrophoresis: A revolution in microbial genetic. *Aspac. J. Mol. Biotechnol.* 2:78-85.
- Suwanto, A., Kaplan, S. 1992. Chromosome Transfer in *Rhodobacter sphaeroides* : Hfr formation and Genetic Evidence for Two Unique Circular Chromosomes. *J. Bacteriol.* 174:1135-1145.
- Timoney, J.F., Gillespie, H.J., Scott, F.W., Barlough, J.E. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8^{ed}. Comstock Publishing Associates. A division of Cornell University Press Ithaca and London pp. 183 -185.
- Wahyuni, A.E.T.H. 2002. *Karakterisasi Fenotipe dan Genotipe Streptococcus agalactiae Isolat Asal Indonesia Penyebab Mastitis Subklinis Pada Sapi Perah*. Disertasi – Institut Pertanian Bogor.
- Wibawan I.W.T., Laemmler, Ch. 1990. Distribution of Group B Streptococcal Types Antigens Among Streptococci of Serological Groups B, G and L. *Zbl. Bakt.* 273:471-477.

Wibawan, IW.T., Pasaribu, F.H., Huminto, H., Estuningsih, S. 1995. *Ciri Biovar Streptococcus agalactiae sebagai Petunjuk Infeksi Silang antara Sapi dan Manusia*. Laporan Hibah Bersaing IV Tahap-I.