

**PEMBUATAN “RAPID TEST” MENGGUNAKAN TEKNIK
“KOAGLUTINASI TIDAK LANGSUNG” UNTUK DETEKSI ANTIBODI
FLU BURUNG**

(Preparation of Rapid Test using Indirect Coagglutination for Detecting Antibody
against Bird Flu)

I Wayan Teguh Wibawan, Titiek Sunartatie
Dep. Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan IPB

ABSTRAK

Sampai saat ini belum tersedia uji aglutinasi cepat untuk mendeteksi keberadaan virus pada suatu individu karena ukuran partikel virus yang sangat kecil. Dengan teknik pembentukan agemat kompleks *Staphylococcus aureus* yang diikat pada antibody kelinci anti IgG marmot anti virus avian influenza (AI) H5N1, aglutinasi antibody terhadap virus tersebut dapat divisualisasi. Untuk merancang prototype kit ini, *S. aureus* diikat pada serum kelinci anti IgG marmot anti virus AI H5N1. Protokol ini mampu mendeteksi secara jelas keberadaan antibody spesifik terhadap virus AI H5N1 pada serum ayam, kelinci dan marmot, berupa reaksi aglutinasi cepat dan jelas pada gelas objek. Reaksi ini tidak dijumpai jika digunakan serum yang tidak mengandung antibody terhadap virus AI H5N1. Diharapkan prototype kit ini dapat dikembangkan dan digunakan untuk mendeteksi antibody spesifik terhadap virus AI H5N1.

Kata kunci: Rapid test, koaglutinasi tidak langsung, antibody H5N1.

ABSTRACT

Until now, there is no rapid agglutination test to detect antibodies to viruses due to the ultra-microscopic character of viral particles. By the help of complex formation of *Staphylococcus aureus* bearing protein A with rabbit IgG-anti guinea pig IgG which previously immunized with avian influenza (AI) virus of H5N1, agglutination of antibodies to viruses can be visualized. To design the prototype of the test, the bacterial cells of *S. aureus* were coupled to a complex compound consisting of rabbit IgG-guinea pig IgG-AI H5N1 antigen. This protocol is able to detect clearly the presence of AI H5N1 antibody in sera of chicken, rabbit and guinea pig, showing the rapid, clear and distinct

Keywords: Rapid test, indirect coagglutination, H5N1 antibody.

PENDAHULUAN

Saat ini penyakit flu burung telah bersifat enzootic pada ayam, sehingga peluang kontaminasi lingkungan oleh virus avian influenza H5N1 sangat tinggi. Masalah yang dihadapi dalam pemantauan virus AI H5N1 adalah beragamnya uji yang digunakan, rumit, mahal dan sering membutuhkan keahlian khusus. Melihat dan merespon permasalahan di atas maka dalam usulan penelitian ini akan dicari

suatu upaya untuk mempermudah aplikasi uji yang digunakan, serta dapat digunakan secara praktis, cepat, murah dan aman untuk setiap jenis induk semang/host yang akan diuji. Dengan memanfaatkan kemampuan Protein A yang dapat berinteraksi dengan Fc-fraksi IgG. Berdasarkan sifat biologis ini kemungkinan besar dapat dibuat *matriks pembeban (Staphylococcus aureus* utuh kaya protein A) yang telah diaktifkan dengan IgG kelinci anti IgG marmot dan matriks ini dapat digunakan sebagai *reagen aglutinator* dalam uji koaglutinasi tidak langsung (*indirect coagglutination*).

Pada industri biologis, misalnya pada perusahaan Farmasi keberadaan ayam yang bersifat *specified pathogenic free* (SPF) sangat dan mutlak dibutuhkan. Ayam-ayam SPF ini secara rutin harus selalu dipantau keberadaannya terhadap sejumlah patogen tertentu agar kondisi SPF-nya dapat dipertahankan. Beberapa alasan penggunaan ayam SPF dalam industri biologis: (1) untuk uji keamanan suatu produk, (2) mendapat hasil percobaan yang baik tanpa intervensi agen penyakit lain, (3) untuk memproduksi vaksin dan pengawasan mutu vaksin. Dalam produksi vaksin campak misalnya, WHO dalam *Technical Series Report* (TRS) No. 840 (1994) menetapkan bahwa ayam SPF yang digunakan harus bebas dan tidak pernah kontak terhadap virus Adeno, Reo, ILT, reticuloendotheliosis, IBD, Marek, ND, Coryza, influenza, para influenza, Salmonella, Mycoplasma, Retro, Avian Encephalitis dan POX. Untuk pemantauan ini maka uji serologis sangat dibutuhkan untuk dilakukan secara berkala sesuai dengan prosedur yang berlaku (Fujikara *et al.*, 1993).

Protein A diketahui sebagai komponen permukaan yang umum ditemukan pada permukaan dinding sel *S. aureus* (Sherris *et al.*, 1984; Kusunoki *et al.*, 1992). Protein A merupakan polipeptida dengan berat molekul 13-45 kDa (kilo Dalton), yang terikat secara kovalen pada lapisan dinding sel *S. aureus* (Forsgren, 1970; Boyle dan Reis, 1987; Kusunoki *et al.*, 1992; Takeuchi *et al.*, 1995). Secara biologis protein A berperan sebagai faktor virulensi bakteri, yaitu mampu berikatan kuat pada bagian Fc (*fragment crystallizable*) dari hampir semua subklas imunoglobulin G (IgG) berbagai spesies, kecuali IgG₃ (manusia); IgG₁ (mencit); IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} (tikus); dan tidak berikatan pada Fc Ig ayam (IgY) dan kambing (Boyle *et al.*, 1985; Harlow dan Lane, 1988). Protein A juga dapat

berikatan dengan bagian Fc IgA dan IgM pada beberapa spesies (Arbuthnott *et al.*, 1983). Bagian Fab (*fragment antigen binding*) pada IgG yang terikat pada protein A menghadap keluar dan bebas berikatan dengan Ag spesifik (Praseno, 1995; Jawetz *et al.*, 1996).

Protein A merupakan reagen penting dalam imunologi dan teknik diagnostik laboratorium. Sebagai contoh pada protein A yang berikatan dengan molekul (IgG) yang diarahkan terhadap antigen (Ag) bakteri tertentu akan mengaglutinasi bakteri yang mempunyai Ag itu (koaglutinasi) (Jawetz *et al.*, 1996). Menurut Wibawan dan Pasaribu (1993), uji koaglutinasi dengan menggunakan protein A merupakan metode yang sangat mudah untuk dilakukan, cepat (30 detik), hasil yang akurat serta murah. Dalam penelitian ini akan dibuat prototype Kit Diagnostik dalam bentuk aglutinator yang terdiri dari IgG kelinci anti IgG marmot yang bereaksi spesifik dengan virus AI H5N1, yang telah dibebani *S. aureus*- protein A.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyiapkan prototipe Kit-Diagnostik Flu Burung dengan menggunakan prinsip-prinsip uji koaglutinasi dengan memperhatikan keandalan prototipe Kit-Diagnostik sehingga layak digunakan di lapangan. Pada akhirnya diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi dasar dalam pengembangan dan produksi Kit Diagnostik Cepat (Rapid Test) terhadap Flu Burung.

METODE PENELITIAN

Isolat Bakteri

Dalam penelitian ini akan digunakan isolat lapang *S. aureus* yang telah diketahui memiliki protein A dari penelitian sebelumnya. Bakteri ditumbuhkan pada perbenihan agar darah selama 18 jam pada 37°C, bentuk koloni dan pola hemolitik yang dihasilkan diamati secara makroskopik. Susunan dan bentuk sel diamati secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram (Carter, 1986). Selanjutnya penentuan spesies bakteri, dilakukan dengan cara : uji glukosa, manitol, katalase dan koagulase.

Penentuan *S. aureus* yang Kaya Protein A

Untuk menentukan kandidat isolat *S. aureus* yang kaya protein A digunakan teknik *serum soft-agar*. Isolat bakteri yang akan diuji diinokulasi ke dalam 10 ml *serum soft-agar* (*Brain Heart Infusion* /BHI+.15% agar dan 100ul serum kelinci), diagitasi dan kemudian diinkubasikan dalam suhu 37°C selama 18 jam. Perubahan bentuk koloni difus menjadi kompak adalah indikator keberadaan protein A pada permukaan sel bakteri (Djannatun, 2002).

Produksi Serum Spesifik H5N1 pada Marmot

Produksi antibody spesifik pada marmot dilakukan dengan menyuntikkan vaksin AI H5N1 Close 1 (IPB-Shigeta) yang dilakukan secara berkala sesuai dengan rekomendasi pabrik. Aplikasi vaksin yang pertama dilakukan dengan menyuntikkan vaksin 0.5 ml secara *intra muscular*, dan diulang bosster 2 minggu kemudian. Keberadaan antibody spesifik H5N1 dalam serum ditentukan dengan uji haeminhibition agglutination test (HI Test) dan agar gel presipitation test (AGPT).

Preparasi Ig G kelinci anti terhadap IgG Marmot

Kelinci divaksinasi dengan sediaan IgG marmot yang telah dimurnikan (1 mg/ml) yang telah disiapkan sebelumnya dengan metode berurutan (*sequential method*) yaitu vaksinasi minggu I sebanyak 0,5 ml, diulang minggu II berturut-turut tiga kali sebanyak 1 ml kemudian diulang lagi minggu III berturut-turut tiga kali sebanyak 1 ml (Zhou *et al.*, 1994). Injeksi dilakukan melalui *vena auricularis*. Satu minggu setelah vaksinasi terakhir darah diambil dari *arteri auricularis*. Darah yang didapat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 18-24 jam. Serum dipisahkan dan disimpan dalam tabung Eppendorf untuk kemudian keberadaan antibody terhadap IgY ayam diuji dengan *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT).

Preparasi Aglutinator

Preparasi matriks pembeban menggunakan bakteri utuh *S. aureus* yang kaya protein A dan padanya diikatkan IgG murni anti IgG marmot. Bakteri utuh sebelum digunakan sebagai pembeban terlebih dahulu diawetkan dengan formaldehid dan secara berkala diuji kelayakannya. Dalam proses ini dilakukan optimalisasi komposisi antara bakteri dengan IgG dengan *box titration* sehingga tidak terjadi *self agglutination*. Pada akhir aktivitas tahap ini akan diperoleh 2 macam reagen yakni reagen matriks pembeban (sediaan A) dan reagen antigen H5N1 yang telah diaktivasi dan terikat dengan IgG marmot (sediaan B). Kedua reagen inilah diharapkan nantinya dapat digunakan sebagai prototipe Diagnostik Kit.

Uji Koaglutinasi

Uji keandalan prototipe diagnostik kit dalam mendeteksi antibodi terhadap H5N1 pada ayam, marmot dan kelinci.

HASIL DAN PEMBAHASAN

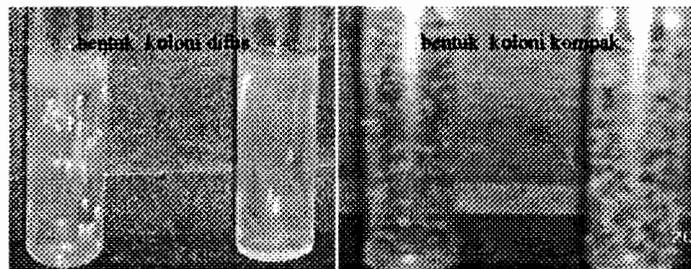
Semua isolat bakteri *S. aureus* yang digunakan bersifat mesofil aerobikal, tumbuh dengan baik setelah diinkubasi dalam media BHI selama 24-48 jam pada suhu $35 \pm 1^{\circ}$ C. Dalam pewarnaan Gram semua isolat berbentuk bulat (kokus), Gram +, motil, aerobik dan aerobik fakultatif, memiliki aktifitas katalase, koagulase dan oxidase serta dapat memfertasikan manitol, koagulase.

Untuk menentukan kandidat isolat *S. aureus* yang kaya protein A digunakan teknik *serum soft-agar* (SSA). Setelah dilakukan identifikasi bakteri dapat ditentukan 13 isolat *S. aureus*, kemudian dilakukan uji SSA untuk mengetahui keberadaan protein A, hasil uji ini terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Penentuan keberadaan protein A pada permukaan sel bakteri *S. aureus* menggunakan uji serum soft-agar

No.	Nama/kode kultur	Hasil Uji pada Serum Soft Agar		Keterangan
		Tanpa Serum	+ serum kelinci 200 μ L	
1.	SA -1	Diffuse	Diffuse	
2.	SA -2	Diffuse	Diffuse	
3.	SA -3	Diffuse	Kompak	
4.	SA -4	Diffuse	Kompak	
5.	SA -5	Diffuse	Kompak	Kandidat
6.	SA -6	Diffuse	Kompak	
7.	SA -7	Diffuse	Diffuse	
8.	SA -8	Diffuse	Diffuse	
9.	SA -9	Diffuse	Diffuse	
10.	SA -10	Diffuse	Diffuse	
11.	SA -11	Diffuse	Kompak	kandidat
12.	SA -12	Diffuse	Diffuse	
13.	SA -13	Diffuse	Diffuse	

Teknik serum soft-agar menggunakan serum kelinci, dapat memisahkan bakteri *S. aureus* yang memiliki dan tidak memiliki protein A pada permukaan selnya. Isolat SA 3, 4, 5, 6 dan 11 bentuk koloni kompak pada serum soft-agar, sedangkan isolat *S. aureus* lainnya tetap menunjukkan koloni difus pada serum soft-agar (Gambar 1).



Gambar 1. Perubahan bentuk koloni difus (sebelum penambahan serum kelinci) menjadi kompak pada *S. aureus* SA5 dan SA11 pada uji serum soft-agar menggunakan serum kelinci

Seluruh isolat yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan pertumbuhan keruh pada media cair THB. Dari 13 isolat *S. aureus*, 5 isolat mengekspresikan keberadaan protein A dan 8 isolat tidak menunjukkan ekspresi protein A pada permukaan selnya. Dari 5 isolat yang memiliki protein A dipilih 2 isolat yakni SA 5 dan SA 11, sebagai kandidat pemb beban matriks berdasarkan kualitas perubahan koloni yang ditampilkan Selanjutnya untuk keamanan dan kenyamanan pekerjaan selanjutnya, kedua isolat ini dibiakkan pada media agar

darah dan digunakan sebagai isolat kerja dan dibuat pula isolat untuk disimpan yang akan digunakan bilamana diperlukan.

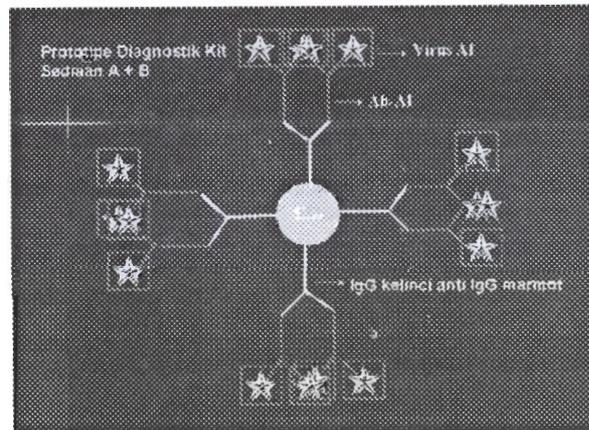
Protein A diketahui merupakan komponen permukaan yang umumnya ditemukan pada *S. aureus* (Sherris *et al.*, 1984; Kusunoki *et al.*, 1992). Protein A merupakan polipeptida dengan berat molekul 13-45 kDa (kilo Dalton), yang terikat secara kovalen pada lapisan dinding sel *S. aureus* (Forsgren, 1970; Boyle dan Reis, 1987; Kusunoki *et al.*, 1992; Takeuchi *et al.*, 1995). Secara biologis protein A berperan sebagai faktor virulensi bakteri, yaitu mampu berikatan kuat pada bagian Fc (*fragment crystallizable*) dari hampir semua subklas imunoglobulin G (IgG) berbagai spesies, kecuali IgG₃ (manusia); IgG₁ (mencit); IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} (tikus); dan tidak berikatan pada Fc Ig ayam (IgY) dan kambing (Boyle *et al.*, 1985; Harlow dan Lane, 1988). Protein A juga dapat berikatan dengan bagian Fc IgA dan IgM pada beberapa spesies (Arbuthnott *et al.*, 1983). Bagian Fab (*fragment antigen binding*) pada IgG yang terikat pada protein A menghadap keluar dan bebas berikatan dengan Ag spesifik (Praseno, 1995; Jawetz *et al.*, 1996).

Pada serum marmot yang disuntik dengan vaksin AI H5N1 setelah dilakukan booster kedua, titer antibodi spesifik H5N1 dapat ditentukan sebesar 2⁷ dan reaksi presipitasi dapat didemonstrasikan pada uji AGPT dan dilakukan permurnian IgG marmot secara afinitas kromatografi menggunakan protein A-Sepharose. Sediaan A diperoleh dengan mencampurkan suspensi SA 5 (10⁹ c.f.u) dengan serum kelinci anti IgG marmot dengan perbandingan 4:1 (v/v), diinkubasi dalam waktu 60 menit. Sediaan B diperoleh dengan melakukan pencampuran antara antigen (virus AI) dengan serum marmot anti virus AI H5N1, optimalisasi racikan dilakukan melalui box titrasi, sehingga pencampuran tadi tidak menimbulkan aglutinasi.

Tabel 2. Teknik SA dan SSA untuk menguji keberadaan protein A pada *S. aureus*

No	Kode Isolat	Sifat tumbuh dalam THB	Bentuk koloni pada SA	Bentuk koloni pada SSA menggunakan serum:	
				Ayam	Kelinci
1	Isolat SA 3, 4, 5, 6 dan 11	keruh	Difus	difus	kompak
2	Isolat SA 1, 2, 7, 8, 9, 10, 12, 13	keruh	Difus	difus	difus
3	<i>S. aureus</i> Cowan 1 (kontrol +)	keruh	difus	difus	kompak
	<i>S. epidermidis</i> (kontrol -)	keruh	difus	difus	difus

Prototipe Diagnostik Kit adalah merupakan reaksi antara sediaan A dan sediaan B, dengan perbandingan tertentu, sehingga diperoleh suatu suspensi yang tidak menunjukkan reaksi aglutinasi. Ilustrasi prototipe Diagnostik Kit ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Prototipe satu partikel koaglutinat Diagnostik-Kit untuk identifikasi antibodi avian influenza H5N1

Untuk aplikasi uji maka dilakukan pengujian terhadap serum ayam yang sebelumnya telah diketahui memiliki antibodi terhadap AI H5N1. Antibodi dalam serum ayam ini diperoleh dari vaksinasi. Sebagai pembanding digunakan darah ayam yang tidak mengandung antibodi terhadap AI H5N1. Hasil menunjukkan bahwa uji koaglutinasi tidak langsung ini mampu mengidentifikasi serum yang mengandung antibodi AI (Gambar 6) dan sebaliknya tidak bereaksi dengan serum ayam yang tidak memiliki antibodi terhadap AI H5N1. Reaksi dapat dibaca dalam waktu 3-5 detik, adanya gumpalan seperti pasir menunjukkan reaksi positif dan sebaliknya reaksi negatif ditunjukkan oleh suspensi yang tetap homogen. Butiran aglutinat dapat diperjelas dengan jalan memberikan zat pewarna yang umum digunakan dalam pewarnaan bakteri, misalnya *Methylen Blue*.

Prototipe kit ini dapat mendeskriminasi beberapa serum yang mengandung antibodi spesifik terhadap H5N1 dengan serum yang tidak mengandung antibodi spesifik ini. Dengan menggunakan masing-masing 5 ekor ayam, 5 ekor kelinci dan 5 ekor marmot yang sebelumnya disensitisasi dengan vaksin inaktif H5N1, keberadaan antibodi dapat dideteksi pada semua serum hewan tersebut. Hal ini

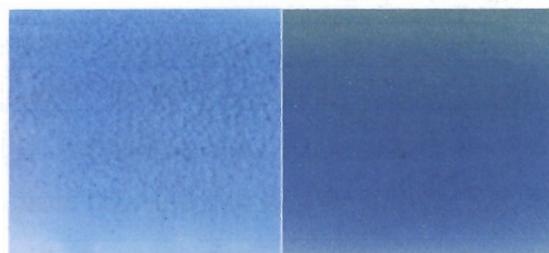
ditunjukkan dengan adanya reaksi koaglutinasi yang jelas dalam waktu 5 detik pengamatan. Reaksi ini tidak dijumpai jika kit direaksikan dengan serum yang tidak mengandung antibodi terhadap AI H5N1 dari masing-masing 5 ekor hewan yang tidak divaksin AI H5N1 (Tabel 3).

Tabel 3. Reaksi koaglutinasi antara prototipe kit dengan serum yang mengandung antibodi AI H5N1 pada berbagai jenis hewan.

	Reaksi Koaglutinasi		
	Kelinci	Marmot	Ayam
Serum hasil vaksinasi menggunakan vaksin AI H5N1*	+++	+++	+++
Serum normal*	-	-	-

* Keterangan: masing-masing serum diambil dari 5 ekor

Penelusuran penulis terhadap informasi ilmiah yang telah dipublikasikan, belum menemukan adanya publikasi yang memuat tentang prinsip penggunaan metode tidak langsung dalam uji koaglutinasi. Penggunaan prinsip uji tidak langsung banyak digunakan untuk teknik heamaglutinasi (*indirect haemagglutination*), ELISA (*indirect ELISA*), *indirect immunomagnetic separation* (IMS) dan *indirect immunofluorescent* (Del Río et al., 2003, Datta et al., 2008, Rufli, 1980, Jesudson, 2005).



Gambar 3. Suatu contoh reaksi aglutinasi (kiri) antara serum ayam yang mengandung antibodi spesifik dengan suspensi aglutinat homolognya dan reaksi negatif (kanan) pada serum ayam normal

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein A tidak dapat berinteraksi dengan Fc-fraksi IgY ayam tetapi dapat berinteraksi dengan Fc-fraksi igG kelinci (Halimah, 2001; Djannatun, 2002). Hal ini berarti IgY ayam tidak

dapat langsung berikatan dengan sel bakteri *S. aureus*, dengan demikian teknik koaglutinasi tidak langsung mutlak dibutuhkan.

KESIMPULAN

Prototipe Diagnostik Kit dengan prinsip Koaglutinasi tidak langsung menggunakan *S. aureus* sebagai pembeban dapat digunakan sebagai uji cepat (*rapid test*) untuk mendeteksi keberadaan antibodi tertentu (avian influenza) dalam serum.

Teknik ini dapat dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen tertentu dalam serum dan dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi dalam berbagai serum hewan dan manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada Institut Pertanian Bogor yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Riset Unggulan IPB tahun 2009. Ucapan terimakasih disampaikan pula kepada Agus Somantri, S.Pd, Ivan Apliantoni dan Sellyn, A.Md. yang banyak membantu dalam pekerjaan laboratorium dan Eri Hermawan, SE. yang banyak membantu dalam penyusunan tulisan dan laporan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arbuthnott, J.P., P. Owen, and R.J. Russel. 1983. Bacterial antigens. *In* Wilson, G., A. Miles, and M.T. Parker (eds) : Topley and Wilson's Principles of Bacteriology Virology and Immunity. 7th. Vol 1. Buttler and Tanner LTD. London.
- Boyle, M.D.P., and K.J. Reis. 1987. Bacterial Fc receptors. *Biol./Technol.* 5:697-703.
- Boyle, M.D.P., W.A. Wallner, G.O. von Mering, K.J. Reis, and M.J.P. Lawman. 1985. Interaction of bacterial Fc receptors with goat immunoglobulins. *Molecular Immunol.* 22 (9):1115-1121.

- Carter, G.R. 1986. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 3rd Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Datta, S., M. E. Janes, and J. G. Simonson. 2008. Immunomagnetic Separation and Coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with Anti-Flagellar Protein Monoclonal Antibody. *Clin. Vacc. Immunol.* 15(10): 1541-1546.
- Bab 1. Del Río, M.L., C.B. Gutiérrez, and E. F. Rodríguez Ferri 2003. Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Tests for Serotyping *Haemophilus parasuis*. *J.Clin. Microbiol.* 41 (2): 880-882.
- Djannatun T. 2002. Metode sederhana dan praktis pengujian keberadaan protein A *Staphylococcus aureus* isolat asal manusia dan sapi perah serta aplikasinya dalam pembuatan perangkat diagnostik. *Disertasi Program Pascasarjana -IPB. Bogor.*
- Forsgren, A. 1970. Significance of protein A production by Staphylococci. *Infect. Immun.* 2 (5): 672-673.
- Fujikara, T., G.J.R. Hovell, O. Hanninen, and K. Pelkonen. 1993. Guidelines for breeding and care of laboratory animals. World Health Organization (WHO) and International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).
- Halimah, L.S. 2001. Kajian serum kelinci poliklonal spesifik terhadap imunoglobulin ayam untuk pengembangan diagnostika. *Thesis Program Pascasarjana -IPB. Bogor.*
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Jawetz, E., J. Melnick, and E. Adelberg. 1996. Mikrobiologi Kedokteran. Ed. 20. Alih Bahasa oleh E Nugroho dan R. F. Maulany. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Pp. 211-217.
- Jesudason, M.V., V. Balaji, S. Sirinsinha and G. Sridharan. 2005. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture supernatants by coagglutination assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 (11):930-939.
- Kusunoki, H., N. Hara, K. Satto, and K. Hasuda. 1992. Protein characterization and immunological properties of the low-molecular-mass protein A isolated from *Staphylococcus aureus* KS 1034. *J. Vet. Med. Sci.* 54 (1):145-148.
- Lesmana, M., R.C. Rockhill, and W.R. Sanborn. 1980. A coagglutination method for presumptive identification of *Salmonella typhi*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 11.(2):302-307.

- Praseno, N. R. 1995. Deteksi *Staphylococcus aureus* dengan Koaglutinasi Kaolin. Makalah Pada KONAS III PAMKI; 3-5 Juli 1995, Jakarta.
- Rufli, T. 1980. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in the routine serological laboratory: Comparative study of coagglutination, direct Immunofluorescence, and sugar fermentation reaction. *British J. Venereal Dis.* 56: 144-147
- Sherris, J.C., K.J. Rian, C.G. Ray, J.J. Plorde, L. Corey, J. Spizizen and M.R. Robinovitch. 1984. *Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Disease*. Elsevier. New York.
- Takeuchi, S., K. Matuda, and K. Sasano. 1995. Protein A in *Staphylococcus aureus* isolates from pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57 (3):581-582.
- Wibawan, I. W. T., dan F. H. Pasaribu. 1993. Peluang pengembangan tes koaglutinasi untuk deteksi serotipe *Streptococcus agalactiae*. *Agrotek.* 1 (2): 43-47.
- Wibawan, I.W.T. 1993. Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren. *Veterinär Medizinische Dissertation*. Justus Liebig Universität, Gießen.
- Wibawan, I.W.T. and C. Lammler. 1991. Influence of capsul neuraminic acid on properties of Streptococci of Serological Group B. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2721-2725.
- Wibawan, I. W. T., dan F. H. Pasaribu. 1993. Peluang pengembangan tes koaglutinasi untuk deteksi serotipe *Streptococcus agalactiae*. *Agrotek.* 1 (2): 43-47.
- Wibawan, I.W.T., C. Lämmmler and F.H. Pasaribu. 1992. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* 138 : 1237-1242.
- Wibawan, I.W.T. 1996. The biovar characteristic of group B streptococci and their relation to disease appearance. *Indonesia Today Science Foundation (ITSF)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zhou, E.M., A. Afshar, R.A. Heckert, and K. Nielsen. 1994. Anti idiotypic antibodies generated by sequential immunization detect the share idio type on antibodies to Pseudorabies Virus antigens. *J. Virol. Methods.* 48:301-313.