



## Pemanfaatan darah manusia yang kadaluarsa sebagai pengganti darah domba dalam pembuatan media Agar Darah Plat (ADP)

### *The use of expired human blood as substitution of the sheep blood in preparation of Blood Agar Media (BAM)*

Titiek Djannatun, Jekti T. Rochani, Riyani Wikaningrum, Dian Widiyanti, Abdul Rahim Pane<sup>\*)</sup>

Department of Microbiology YARSI UNIVERSITY School of Medicine, Jakarta

<sup>\*)</sup>Late author

**KEYWORDS** *blood agar media; nearly expired human blood; expired human blood*

**ABSTRACT** *The use of blood agar media to grow and to isolate the pathogenic bacteria, and to compare the hemolytic ability of the bacteria is well known. The aim of this study was to investigate the possibility of using expired human blood as substitute for the sheep blood agar media. In this study five days before expired and five days after expired human blood were washed once, twice and centrifuged. Sheep blood was used as positive control and five days after and before expired blood without treatment was used as negative control. The prepared media were used to grow six isolates wild strain bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β haemolyticus*, *Streptococcus γ haemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio El Tor* and *Clostridium perfringens*). The result indicated that blood agar medium, prepared using human blood which was nearly expired or expired, have the same results in culture growth of the tested bacteria compared to the standard blood agar had media using sheep blood.*

Media agar darah digunakan untuk menumbuhkan dan mengisolasi mikroorganisme patogen terutama mikroorganisme yang untuk pertumbuhannya membutuhkan darah seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria sp.* Agar darah juga digunakan untuk mendeteksi dan membedakan kemampuan hemolisa bakteri seperti *Streptococcus sp.* (Mims, 1982; Carter, 1986; Cheesbrough, 1991). Daya lisis *Streptococcus* terhadap darah merupakan salah satu cara pengelompokan untuk melakukan uji biokimia lainnya, karena daya hemolisis merupakan tes pendugaan terhadap kelompok tertentu *Streptococcus*. Disamping itu strain *Streptococcus* yang menyebabkan hemolisis selalu dihubungkan dengan kemampuan kuman menyebabkan infeksi (Wibawan and Laemmler, 1990; Brooks *et al.*, 2001; Hof and Dörries, 2002).

Media agar darah dibuat dari medium basal dengan penambahan darah 5-10% (defibrinasi) pada suhu 50-60°C. Darah yang biasa digunakan untuk mengisolasi dan menumbuhkan mikroorganisme patogen adalah darah kuda, domba, kambing dan kelinci yang mengalami proses defibrinasi (Anonymous, 1982).

Darah domba mengandung inhibitor terhadap *Haemophilus influenzae*. Darah domba yang selama ini sering digunakan untuk percobaan mempunyai komposisi eritrosit 11 juta per mm<sup>3</sup>, lipid, protein, (albumin, globulin), glukosa, asam amino, urea, keratin, natrium, kalium, magnesium, fosfat, mangan, kobal, tembaga, seng dan yodium.

Darah manusia yang sudah kadaluarsa dengan seluruh komponen yang dikandungnya masih memperlihatkan warna seperti darah segar, namun secara hematologi tidak boleh ditransfusikan kepada pasien. Darah manusia yang sudah kadaluarsa telah sangat berkurang faktor-faktor pembekuannya, dan hal ini memenuhi persyaratan untuk pembuatan medium biakan, karena darah yang mengandung faktor pembekuan harus didifibrinasi.

*Correspondence:*

DR. Drh. Hj. Titiek Djannatun, Department of Microbiology, YARSI UNIVERSITY School of Medicine, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Telephone (021) 4206674, 4206675, 4206676, Facsimile (021) 4244574

Darah kadaluwarsa masih mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan untuk pertumbuhan kuman. Tetapi menurut Cheesbrough (1991) penggunaan darah manusia, terutama darah yang hampir kadaluwarsa sebaiknya dihindari karena mengandung substansi inhibitor terhadap beberapa mikroorganisme patogen. Darah manusia tidak digunakan untuk menumbuhkan *Streptococcus* karena mengandung sitrat (dari antikoagulan) yang menghambat pertumbuhan *Streptococcus β hemoliticus* dan glukosa yang dapat mengubah tipe hemolisis yang dihasilkan (Cheesbrough, 1991).

Dalam penelitian ini akan diamati apakah media agar darah manusia yang telah kadaluwarsa 5 hari dan 5 hari menjelang kadaluwarsa memiliki kemampuan menumbuhkan, isolasi dan diferensiasi koloni bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemoliticus*, *Streptococcus γ hemoliticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio El Tor* dan *Clostridium perfringens*) yang sama dengan media agar darah (darah domba).

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI selama ± 3 bulan (Agustus-Oktober 2002) dengan menggunakan 6 isolat lapang (*wild strain*) yang diperoleh dari Laboratorium. Isolat yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β - hemoliticus*, *Streptococcus γ -hemoliticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio El Tor* dan *Clostridium perfringens*. Darah manusia yang digunakan adalah darah manusia golongan O yang sudah 5 hari kadaluwarsa dan 5 hari menjelang kadaluwarsa, sedangkan sebagai pembanding digunakan darah domba. Dalam eksperimen, digunakan darah manusia yang dicuci dengan larutan NaCl fisiologis satu kali, dua kali dan sentrifugasi serta darah manusia tanpa pengolahan.

### A. Penentuan jumlah inokulum

Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 18 - 24 jam pada 37° C pada suasana aerob untuk bakteri aerob dan anaerob untuk bakteri anaerob disuspensikan dalam NaCl fisiologis. Penentuan jumlah inokulum terbaik dilakukan dengan metode *serial dilution* dan *Total Plate Count* (TPC) (Norrel & Messley, 1997)

### B. Pengolahan darah manusia

Darah manusia yang digunakan adalah darah yang menjelang 5 hari kadaluwarsa dan 5 hari sudah kadaluwarsa yang telah diukur pHnya.

Pengolahan darah manusia dilakukan dengan pencucian satu kali, dua kali dan disentrifugasi.

#### B.1. Pencucian darah satu kali

Darah manusia sebanyak 100 cc diendapkan selama 3 hari pada suhu 4°C. Endapan dialirkan ke dalam labu Erlenmeyer 1L dan ditambahkan NaCl fisiologis hingga 500cc. Suspensi dikocok perlahan-lahan hingga homogen kemudian diendapkan kembali pada 4°C selama 24 jam. Endapan yang mengandung RBC disuspensikan dengan NaCl fisiologis hingga volume awal. Suspensi yang diperoleh dipakai untuk pembuatan agar darah plat (ADP).

#### B.2. Pencucian darah dua kali

Proses yang sama (B.1) diulangi sekali lagi untuk pencucian 2 kali.

#### B.3. Sentrifugasi

Darah manusia sebanyak 100 cc disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 15 menit untuk menghilangkan faktor inhibitor pertumbuhan bakteri.. Endapan disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis hingga sama dengan volume awal. Sentrifugasi diulang kembali dengan cara yang sama. Endapan (RBC) yang diperoleh diresuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis hingga sama dengan volume awal dan digunakan untuk pembuatan medium ADP dan kaldu darah (untuk bakteri anaerob).

### C. Penentuan kemampuan medium ADP untuk mengisolasi dan mendiferensiasi koloni bakteri

Keunggulan medium ADP yang menggunakan darah manusia (5 hari sebelum dan sudah kadaluwarsa) dengan proses pencucian satu kali, dua kali dan sentrifugasi dilihat dari kemampuannya untuk menumbuhkan (TPC), mengisolasi dan mendiferensiasi koloni bakteri dibandingkan dengan medium ADP yang menggunakan darah domba dan medium ADP dari darah manusia (5 hari sebelum dan sudah kadaluwarsa) yang tidak mengalami pengolahan (pencucian). Isolat bakteri diinokulasikan dengan menggunakan spatel pada setiap medium dan diinkubasikan aerob untuk bakteri aerob & anaerob untuk bakteri anaerob pada suhu 37°C selama 18 -24 jam (Wistreich, 1997). Parameter yang dilihat adalah pertumbuhan bakteri pada medium dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh (*Colony forming unit*) dan mendiferensiasikan morfologinya.

## HASIL

Hasil penelitian menunjukkan, kemampuan media agar darah plat (ADP) yang mengandung darah manusia yang kadaluwarsa, mengisolasi bakteri aerob (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β-hemoliticus*, *Streptococcus γ-hemoliticus*, *Streptococcus*

*pneumoniae*, *Vibrio El Tor*) dan bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) dibandingkan media ADP (darah domba) dan media ADP (darah manusia sebelum kadaluwarsa) bervariasi untuk masing-masing bakteri, sebagaimana terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 3.

Tabel 1. Kemampuan media ADP (darah manusia dan darah domba) mengisolasi bakteri aerob

Perlakuan	Total Plate Count (TPC)				
	Sa (10 <sup>9</sup> )	S.pn (10 <sup>6</sup> )	S <sub>γ</sub> (10 <sup>6</sup> )	S <sub>β</sub> (10 <sup>5</sup> )	VE (10 <sup>6</sup> )
<b>Darah manusia (A)</b>					
Tanpa perlakuan	1576	430	172,5	686	6,5
Pencucian 1 kali	1462	638	202	266	8
Pencucian 2 kali	990	562	362	420	10
Sentrifugasi	934	916	248	864	5
<b>Darah manusia (B)</b>					
Tanpa perlakuan	1228	746	151,5	1150	9
Pencucian 1 kali	1688	856	300	272,5	11,5
Pencucian 2 kali	1488	888	125	514	8,5
Sentrifugasi	1140	835	138	1394	13
<b>Darah domba (kontrol)</b>	452	1424	188	2304	10

A=5 hari sebelum kadaluwarsa; B=5 hari sesudah kadaluwarsa; Sa=*Staphylococcus aureus*; S.pn = *Streptococcus pneumoniae*; S<sub>γ</sub>= *Streptococcus γ-hemoliticus*; S<sub>β</sub>= *Streptococcus β-hemoliticus*; VE=*Vibrio El Tor*

Media ADP dapat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri tertentu dalam menghemolisis darah. Pada penelitian ini sifat hemolisis bakteri aerob masih dapat terlihat pada Tabel 2., dan sifat bakteri anaerob pada Tabel 3.

Tabel 2. Kemampuan media ADP (darah manusia dan darah domba) menunjukkan sifat hemolisis bakteri aerob

Perlakuan	hemolisis				
	Sa	S.pn	S <sub>γ</sub>	S <sub>β</sub>	VE
<b>Darah manusia (A)</b>					
Tanpa perlakuan	++	++	++	++	++
Pencucian 1 kali	++	++	++	++	++
Pencucian 2 kali	++	++	++	++	++
Sentrifugasi	++	++	++	++	++
<b>Darah manusia (B)</b>					
Tanpa perlakuan	++	++	++	++	++
Pencucian 1 kali	++	++	++	++	++
Pencucian 2 kali	++	++	++	++	++
Sentrifugasi	++	++	++	++	++
<b>Darah domba (kontrol)</b>	+++	+++	+++	+++	+++

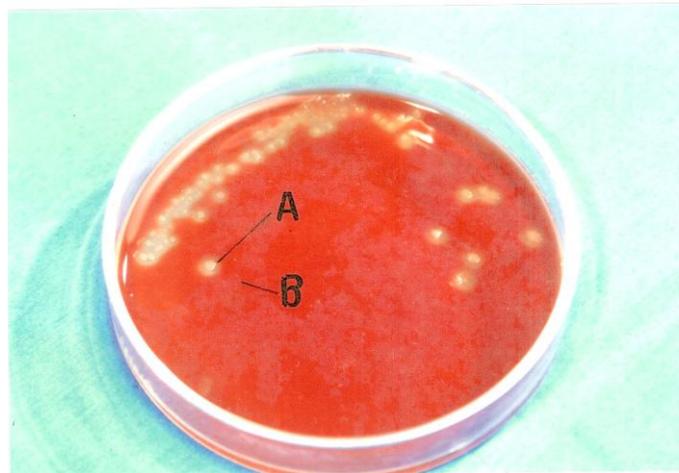
A=5 hari sebelum kadaluwarsa; B=5 hari sesudah kadaluwarsa; Sa=*Staphylococcus aureus*; S.pn = *Streptococcus pneumoniae*; S<sub>γ</sub>= *Streptococcus γ-hemoliticus*; S<sub>β</sub>= *Streptococcus β-hemoliticus*; VE=*Vibrio El Tor*; +++ = sangat baik; ++ = baik

Tabel 3. Kemampuan media ADP (darah manusia dan domba) mengisolasi dan menunjukkan sifat hemolisis bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*)

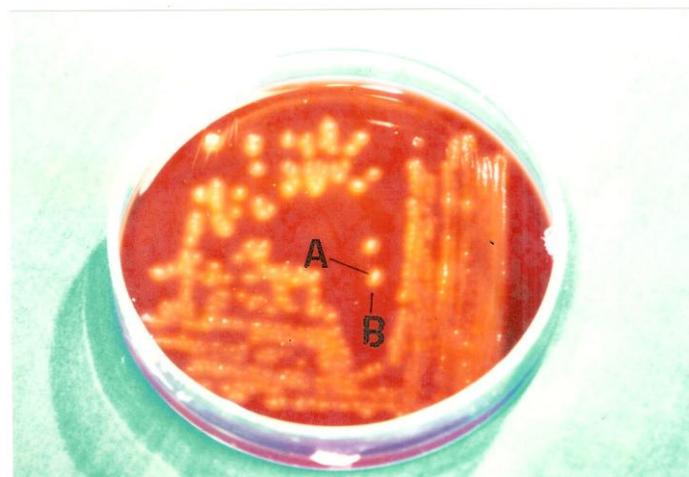
Perlakuan	TPC ( $10^7$ )	Sifat hemolisis bertingkat
<b>Darah manusia (A)</b>		
Tanpa perlakuan	7	+++
Sentrifugasi	9	+++
<b>Darah manusia (B)</b>		
Tanpa perlakuan	10,5	+++
Sentrifugasi	9,5	+++
<b>Darah domba (kontrol)</b>	17,5	+++

A=5 hari sebelum kadaluwarsa; B=5 hari sesudah kadaluwarsa; TPC=Total Plate Count; +++ = sangat baik

Kemampuan media ADP (darah manusia kadaluwarsa dan darah domba) dalam menunjukkan sifat hemolisis bakteri *Clostridium perfringens* dapat terlihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Sifat hemolisis *Clostridium perfringens* pada media ADP (darah domba)  
Ket. Gambar: A = hemolisis  $\beta$ , B = hemolisis  $\alpha$



Gambar2. Sifat hemolisis *Clostridium perfringens* pada media ADP (darah manusia kadaluarsa)  
Ket. Gambar: A = hemolisis  $\beta$ , B = hemolisis  $\alpha$

Disamping itu, kemampuan media/perbenihan kaldu darah yang mengandung darah manusia yang kadaluwarsa, mengisolasi bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) dibandingkan media ADP (darah domba) dan media ADP (darah manusia sebelum kadaluwarsa) terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pertumbuhan bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) pada perbenihan kaldu darah (BHI)

Kaldu darah (BHI)	Pembentukan gas	hemolisis
<b>Darah manusia (A)</b>		
Tanpa perlakuan	++	++
Sentrifugasi	++	++
<b>Darah manusia (B)</b>		
Tanpa perlakuan	+++	++
Sentrifugasi	++	++
<b>Darah domba (kontrol)</b>	+++	+++

A=5 hari sebelum kadaluwarsa; B=5 hari sesudah kadaluwarsa; ++ = baik; +++ = sangat baik

## PEMBAHASAN

Berdasarkan Tabel 1., media ADP (darah domba) mampu mengisolasi bakteri *Streptococcus* lebih baik dibandingkan ADP (darah manusia), terlihat dari pertumbuhan bakteri (TPC) yang lebih banyak pada media ADP (darah domba). Bakteri *Streptococcus* adalah bakteri yang untuk pertumbuhannya mutlak membutuhkan faktor-faktor yang terdapat di dalam darah (Cotral, 1978; Mims, 1982; Carter 1986; Brooks *et al.*, 2001; Hof and Dörries, 2002). Menurut Cheesbrough (1991) penggunaan darah manusia sebaiknya dihindari karena mengandung substansi inhibitor.

Pada hasil penelitian untuk bakteri *Streptococcus pneumoniae*, media ADP (darah manusia kadaluwarsa dan sebelum kadaluwarsa), pengolahan darah membuat kemampuan mengisolasi media lebih baik dibandingkan media dengan darah tanpa pengolahan dan pengolahan dengan sentrifugasi lebih baik dibandingkan pencucian 1 kali dan 2 kali. Hal ini menunjukkan bahwa pengolahan dapat menghilangkan faktor-faktor inhibitor kuman tetapi tidak menghilangkan nutrisi dan faktor pertumbuhan bakteri. Sedangkan untuk mengisolasi *Streptococcus γ-hemoliticus*, sebaiknya dilakukan pengolahan darah kadaluwarsa dengan pencucian 1 kali.

Penggunaan darah manusia kadaluwarsa untuk media ADP yang akan digunakan untuk mengisolasi *Streptococcus β-hemoliticus* tanpa pengolahan atau pengolahan cara sentrifugasi cukup baik. Hal ini mungkin disebabkan karena pengolahan darah dengan sentrifugasi cukup mampu menghilangkan faktor inhibitor pertumbuhan bakteri, sedangkan bakteri dapat tumbuh baik pada media

ADP (darah manusia kadaluwarsa) karena adanya bahan nutrisi yang cukup.

Fallon *et al.* (2000) melakukan penelitian dengan menggunakan media ADP untuk mengisolasi Bakteri *Streptococcus B hemolyticus* dari usap tenggorok pasien. Media ADP yang digunakan mengandung 5% darah kuda yang sudah dilakukan defibrinasi (*Columbia Agar base/CM 321 Oxoid*), 10 mg/L *oxalinic acid* dan 5 mg/L *metronidazole*. Hasil penelitian menunjukkan media ADP memiliki kemampuan mengisolasi bakteri yang sangat baik, tetapi pembuatan media lebih kompleks dan lebih mahal sehingga tidak disarankan untuk penggunaan rutin di laboratorium. Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Chadwick and Oppenheim (1995) dengan menggunakan media ADP yang diberi *neomycin* untuk mengisolasi *Vancomycin resistant Enterococcus faecium*.

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang untuk pertumbuhannya tidak membutuhkan darah tetapi penambahan darah pada media akan menambah nutrisi, sehingga bakteri akan tumbuh subur. Hasil penelitian menunjukkan kemampuan media ADP (darah manusia kadaluwarsa maupun sebelum kadaluwarsa) mengisolasi bakteri lebih baik dibandingkan media ADP (darah domba). Hal ini mungkin karena darah manusia mengandung nutrisi untuk pertumbuhan bakteri tersebut lebih banyak dibandingkan darah domba. Oleh karena itu pengolahan sentrifugasi akan mengurangi nutrisi dalam darah dan menurunkan kemampuan media mengisolasi bakteri.

Sedangkan untuk bakteri *Vibrio El Tor* tidak terdapat suatu perbedaan kemampuan mengisolasi yang nyata antara media ADP (darah manusia kadaluwarsa dan sebelum kadaluwarsa) disbanding-

kan media ADP (darah domba). Namun penggunaan darah manusia kadaluarsa untuk media ADP yang paling baik untuk mengisolasi bakteri ini adalah dengan pengolahan sentrifugasi. Hal ini mungkin disebabkan karena pengolahan sentrifugasi dapat menaikkan pH darah, karena bakteri *Vibrio El Tor* untuk pertumbuhannya baik pada perbenihan dengan pH mendekati 9,0 (Brooks *et al.*, 2001; Hof and Dörries, 2002).

Tabel 2 memperlihatkan tidak ada penurunan daya hemolisis yang berarti pada bakteri-bakteri aerob yang ditanam pada media ADP (darah manusia kadaluarsa). Semua strain yang ditanam pada medium ADP darah manusia kadaluarsa tanpa pengolahan maupun dengan berbagai pengolahan memperlihatkan zona hemolisis yang sama dengan hemolisis yang diperlihatkan pada medium ADP darah domba. Dengan demikian media ADP darah manusia kadaluarsa dapat digunakan untuk membedakan morfologi koloni bakteri.

Beta hemolisin ditemukan terutama pada *Staphylococcus aureus* strain manusia yang menghasilkan zona lebar dengan hemolisis komplit. Beta hemolisin juga terdapat pada strain hewan terutama sapi dengan inkubasi 37°C akan memproduksi hemolisis tidak komplit menjadi komplit, saat inkubasi waktu disimpan pada suhu 4°C. Delta hemolisin menghasilkan hemolisis yang sempit dan komplit. Hemolisin ini dibentuk oleh strain manusia dan hewan (Jarp, 1990; Bisming and Amstberg, 1993).

Hasil penelitian untuk bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) menunjukkan kemampuan menghemolisa media ADP darah kadaluarsa (tanpa maupun dengan pengolahan sentrifugasi) yang baik bila dibandingkan dengan media ADP darah domba. Bakteri yang ditanam memperlihatkan zona hemolisa bertingkat yang khas (Gambar 1 dan Gambar 2). Hal ini penting dalam identifikasi koloni *Clostridium perfringens* (Tabel 3 dan 4). Berdasarkan hal tersebut terbukti darah kadaluarsa masih mengandung lesitin dan sentrifugasi tidak merusak lesitin dalam darah. Zona hemolise yang dibentuk bakteri karena adanya enzim lesitinase,  $\beta$ -hemolitik dibentuk oleh enzim lesitinase yang aktif pada suhu dibawah 37°C (Brooks *et al.*, 2001; Hof and Dörries, 2002).

Kemampuan media ADP (darah manusia kadaluarsa maupun sebelum kadaluarsa) mengisolasi bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) tidak sebaik media ADP darah domba (Tabel 3). Hal ini menunjukkan darah domba lebih banyak mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan yang dibutuhkan bakteri. Sedangkan untuk melihat sifat

pembentukan gas bakteri, darah manusia kadaluarsa tanpa pengolahan memperlihatkan hasil yang sama dengan darah domba pada media kaldu darah (BHI) (Tabel 4).

## KESIMPULAN

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa darah manusia kadaluarsa masih dapat digunakan sebagai pengganti darah domba untuk menumbuhkan (TPC), mengisolasi dan mendiferensiasi koloni bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus  $\beta$ -hemolyticus*, *Streptococcus  $\gamma$ -hemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio El Tor* dan *Clostridium perfringens*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih saya sampaikan pada dr. Suci Mulyati, Mkes. (alumni Fakultas Kedokteran Universitas YARSI/FKUY) pada saat itu berdinis sebagai staf medis UTDD-PMI DKI yang telah membantu dalam penyediaan darah manusia, pada FKH-IPB yang membantu dalam memperoleh darah domba, serta bagian Mikrobiologi FKUY yang memberi kesempatan menggunakan fasilitas untuk melakukan penelitian.

## KEPUSTAKAAN

- Anonymous 1982. *The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services*. 5<sup>th</sup> ed. UK. Oxoid Limited
- Bisming W and Amstberg G 1993. *Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogen in animals*. Paul Parey Scientific Publisher. Hamburg.
- Brooks GF, S. Butel and SA Morse 2002. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology)*. Ed. 1. Penerjemah dan Editor Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba Medika.
- Carter GR 1986. *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Chadwick PR and B.A. Oppenheim 1995. *Neomycin Blood Agar As A selective Medium for Vancomycin Resistant Enterococcus faecium*. *J. of Clin. Pathol.* 48(11): 1068-1070.
- Cheesbrough M 1991. *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*, volume II: Microbiology. Cambridge. ELBS.
- Cottral GE 1978. *Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology*. Cornell University Press. London.
- Fallon D, K.J. Nye, B. Gee, S. Messer, R.E. Waren, and N. Andrew. 2000. *A Comparison of Columbia Blood Agar With Or Without Oxolinic Acid/Metronidazole for The Isolation of  $\beta$ -haemolytic Streptococcus from throat Swabs*. *J. med. Microbiol.* (49): 941-942.
- Hof H and R. Dörries 2002. *Medizinische Mikrobiologie*. 2., Korrigierte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Jarp J 1990. *Staphylococcus from Mastitis in Ruminants: Virulence Properties and Classification of species*. *Dissertation Abstracts International, C, Worldwide*. (51): 2, 209 C.
- Mims CA 1982. *The Pathogenesis of Infectious disease*. 2<sup>nd</sup> Ed. Acad. Press. London. New York. San Francisco. Sao Paulo. Sydney. Tokyo. Toronto. Pp.56-81.

Norrel SA & K.E. Messley 1997. *Microbiology Laboratory Manual: Principles and Applications*. New Jersey. Prentice Hall.

Wibawan IWT and Laemmler 1990. *Properties of Group  $\beta$  streptococci With Protein Surface antigens X and R*. *J. Clin. Microbiol.* (28): 2834-2836.

Wistreich GA 1997. *Microbiology Laboratory: Fundamentals and Applications*. New Jersey. Prentice Hall.