

**M-KID(MASTITIS KID
DETECTION): INOVASI
PEMBUATAN DETEKSI MASTITIS
YANG DIAPLIKASIKAN PADA
PETERNAKAN SAPI PERAH DI
KOTA MALANG**

**Dimas Rizky Erste Putra¹⁾, Muhammad
Wildan²⁾, Farras Shanda³⁾, Hendri
Ramdhoni⁴⁾, Deny Hairurrozikin⁵⁾**
Program Studi Pendidikan Dokter Hewan,
Universitas Brawijaya^{1,2,3,4,5)}

¹dimasputra78@yahoo.com

²m.wildan25@ymail.com

³farras.shanda@gmail.com

⁴hendri_hendrot@yahoo.com

⁵denyhr15@gmail.com

Abstract

Mastitis is an inflammation internal tissues of the mammary gland and marked by physical and chemical changes in milk quality with or without pathological changes of mammary gland. In subclinical mastitis there are visible sign detected except with a Mastitis detector or mastitis detection methods. Mastitis detection is very expensive for farmers and the reagents are harmful for cows, farmers and the environment. Therefore, it is necessary to develop mastitis detection tool that is easy to use and applicable. This mastitis detection tool using reagents biosurfactant from Pseudomonas sp. which grown in minimum media containing vegetable oil in concentration of 25% and incubation period of 24 hours. M-KID prototype tool made from glass and it is proven that the tool could be use as diagnostic test for subclinical mastitis in dairy cows, it has high level of accuracy and accountable compared to mastitis reagan and mastitis tools that have been sold in the market.

Key words: *Mastitis, Milk, Mastitis detection Equipment, Pseudomonas sp., Biosurfactants*

1. PENDAHULUAN

Susu berperan penting dalam memenuhi kebutuhan protein hewani bagi masyarakat Indonesia. Permintaan susu dari waktu ke waktu semakin meningkat, karena jumlah penduduk yang terus meningkat disertai dengan peningkatan pendapatan dan pengetahuan tentang pentingnya pola hidup sehat. Namun demikian kondisi ini belum disertai dengan ketersediaan susu yang mencukupi untuk memenuhi kebutuhan konsumen baik secara kuantitas maupun kualitas. Produksi susu dalam negeri baru dapat memenuhi sebanyak 40% kebutuhan sedangkan 60% lainnya dipenuhi dari susu impor. Ketidakmampuan dalam memenuhi permintaan susu tersebut dikarenakan produktivitas sapi perah Indonesia rata-rata masih rendah baik secara kuantitas maupun kualitas (Rosena, 2010). Salah satu penyebabnya adalah penyakit mastitis atau radang ambing yang berdampak terhadap produksi Dan kualitas susu

Mastitis merupakan radang pada jaringan interna kelenjar ambing yang ditandai oleh perubahan fisik maupun kimia air susu dengan disertai atau tanpa disertai patologis pada kelenjar mammae (Morin and Hurley, 2003; Salasia dkk, 2004) dan merupakan penyakit yang secara ekonomi merugikan peternak sapi perah di seluruh dunia (Subronto, 2003). Mastitis disebabkan oleh bermacam-

macam penyebab (Blood and Henderson, 2007) di antaranya karena trauma atau gangguan fisiologis (Andrews, 2000), tetapi kerugian ekonomi penyakit ini seringkali disebabkan adanya infeksi bakteri (Dodd and Booth, 2001) diantaranya *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* (Quinn et al., 2002, Subronto, 2003). *Staphylococcus aureus* menjadi perhatian khusus karena merupakan patogen utama dari penyebab mastitis pada sapi perah (Prescott et al., 2003).

Menurut Sudono, Rosdiana, Setiawan (2003) terdapat dua jenis mastitis pada sapi perah yaitu mastitis klinis dan subklinis. Pada mastitis klinis gejala klinis pada hewan sakit dapat terlihat yaitu ambing bengkak, panas dan adanya rasa sakit jika disentuh. Demikian juga susu yang dihasilkan produksi menurun dan terlihat menyimpang dari karakteristik susu normal. Sedangkan pada mastitis subklinis tidak terdapat tanda-tanda yang menunjukkan hewan sakit dan susu terlihat normal sehingga diperlukan alat bantu untuk deteksi adanya mastitis. California mastitis test (CMT), merupakan satu-satunya metoda uji untuk deteksi mastitis subklinis yang selama ini digunakan.

Reaksi pada CMT harus dinilai selama 15 detik setelah pencampuran karena reaksi akan melemah dan hilang setelah itu (Ruegg, 2002). Reagen yang digunakan adalah alkyl aryl sulfonate 1%, NaOH 1,5%, dan indikator Broom Kresol purple. Alkyl aryl sulfonate merupakan

bahan kimia detergen. Uji mastitis lain yang menggunakan detergen yaitu "Scalm Mastitis Test" (SMT). Penggunaan Alky aryl sulfonat sebagai bahan utama pada uji mastitis memberikan dampak kurang baik karena dapat menyebabkan pencemaran lingkungan (Subronto, 2003). Sehingga diperlukan adanya metode baru untuk mengurangi penggunaan bahan kimia, salah satunya dengan penggunaan biosurfaktan yaitu surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Keuntungan yang paling signifikan pada penggunaan bakteri surfaktan dibanding kimia surfaktan adalah penerimaan lingkungan. Beberapa keuntungan dari biosurfaktan diantaranya adalah toksisitas yang rendah, biodegradabilitas, selektif, aktifitas spesifik dalam suhu ekstrem, pH, dan Salinitas, serta produksi melalui fermentasi. Hal ini memiliki potensi dalam perlindungan dan manajemen lingkungan (Abouseoud, 2007)

Biosurfaktan dapat dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme, adanya keanekaragaman sumber mikroorganisme menghasilkan biosurfaktan dengan struktur kimia, fungsi dan manfaat yang berbeda (Parra et al., 1989). Berdasarkan penelitian PKM-P MASTECH (Mastitis Detection Technology) biosurfaktan dapat digunakan sebagai bahan dasar deteksi mastitis subklinis (Agung dkk, 2012). Oleh karena itu perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut untuk memanfaatkan biosurfaktan pada suatu

alat deteksi mastitis yang mudah digunakan dan diaplikasikan.

2. METODE

Rancangan pembuatan

Pembuatan Kit Deteksi mastitis ini menggunakan dasar ilmiah dalam penelitian sebelumnya yaitu MASTECH (Mastitis Detection Technology). Metode Deteksi mastitis menggunakan biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.*, dimana reagen yang dihasilkan dalam pembuatan Kit deteksi mastitis berbentuk seperti jam pasir. Desain M-Kid sangat sederhana, mudah dibawa dan mudah digunakan oleh peternak sehingga untuk dapat membantu untuk mendeteksi penyakit mastitis sub klinis secara mudah, aman, dan cepat.

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Reagen diambil langsung dari biosurfaktan yang sudah dikembangkan pada penelitian sebelumnya dalam mendeteksi mastitis. Pelaksanaan penelitian di laboratorium berlangsung selama 5 bulan.

Alat dan bahan

Alat yang diperlukan antara lain :

Cawan petri, tabung reaksi, objek glass, jarum ose, Bunsen, beacker glass, erlenmeyer, gelas ukur, pegaduk kaca, oven, vortex, kulkas, timbangan elektrik, timbangan analitik, sentrifugator, inkubator, autoklaf, lampu UV, dan Laminar Air Flow (LAF).

Bahan yang diperlukan, antara lain :

Blood Agar Plate (BAP), *oksidase stick*, *pepton water 0,1%*, bahan-bahan untuk pewarnaan Gram (kristal violet, safranin, acetone alkohol) akuades, alkohol 70%, desinfektan, TSA, plastic polycarbonate, stopwatch.

Tahap Pekerjaan

1. Isolasi Bakteri *Pseudomonas sp.*

Isolasi bakteri diambil dari sampel susu segar yang berasal dari peternak rakyat dan diambil pada pemerahan pukul 05.30 WIB. Metoda isolasi menggunakan metoda standar pengujian mikroorganisme. Pengenceran susu dilakukan menggunakan Buffer Peptone Water 10%. Penanaman dilakukan pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} dengan metode teknik agar tuang pada media TSA. Setelah inkubasi pada 30°C selama 48jam, dilakukan penghitungan koloni bakteri dan seleksi bakteri untuk pemurnian (jumlah koloni 25-250). Selanjutnya dilakukan pemurnian ke media TSA dengan metode streak dari koloni biakan pertama. Dilakukan inkubasi pada 30°C selama 48jam dan persiapan pembuatan media TSA miring. Tanam pada media agar miring TSA dan disimpan sebagai *seed culture*.

2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi *Pseudomonas sp.* dilakukan berdasarkan sifat morfologi, pewarnaan Gram dan uji biokimia yang indol, MR-VP, citrate, H²S, glukosa, sukrosa, laktosa, oksidase dan katalase. Karakterisasi morfologi yang diamati adalah warna, tepi, elevasi dan bentuk dan penataan selnya.

3. Produksi Biosurfaktan

Aquadest sebanyak 75 ml di masukan ke dalam erlenmayer 250 ml. kemudian masukan vegetable oil sebanyak 25 ml ke dalam erlenmayer tersebut. Vortek agar aquadest dan vegetable oil sedikit homogen. sterilisasi minimum media tersebut dengan suhu 121°C selama 15 menit. Isolat bakteri di kultur pada media nutrient broth sebanyak 5 ml dan di inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 37°C. kemudian isolat bakteri sebanyak 2 ml pada media NB di ambil dan di masukkan ke dalam minimum media yang sudah di sterilkan. Lakukan vortex agar homogen kemudian inkubasi dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu 30°C selama 24 jam. Hasil fermentasi kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3300 rpm selama 33 menit. Supernatan yang dihasilkan adalah biosurfaktan, dipisahkan dan disimpan untuk diuji selanjutnya.

4. Pembuatan Alat Uji Deteksi Mastitis

Siapkan bahan baku berupa kaca pyrex, setelah itu bahan baku di bentuk menyerupai bentuk jam pasir dengan

memiliki 2 lubang masing-masing berdiameter 2 cm pada bagian ujung tabung atas dan tabung bawah dengan menggunakan metode pemanasan suhu tinggi pada kaca pyrek. Lubang bagian atas ditutup dengan plastik karet untuk menyumbat lubang agar ketika di gunakan cairan tidak tumpah keluar dan bekerja sempurna. Serta pada alat deteksi di tambahkan alat penghitung Watu (*stopwatch*) sebagai indikator keparahan mastitis yang terjadi maupun prosedur penggunaan dan indikatornya. Pembuatan alat dikerjakan pada bengkel pengrajin kaca Netha's Art di sidoarjo Jawa Timur dengan bantuan pengrajin kaca di tempat itu.

5. Penghitungan Sel Somatik Sampel Susu (JSS)

Sampel susu yang akan diujikan sebelumnya telah dihitung jumlah sel somatiknya sebagai gold standard dalam pengujian mastitis. Sehingga sampel susu dapat dikelompokkan sesuai dengan tingkat keparahannya (subklinis dan klinis).

Berikut ini merupakan langkah-langkah penghitungan sel somatik menurut Wahyono, dkk., (2003) :

1. Gelas obyek dibersihkan dengan eter alkohol kemudian letakkan di atas kertas *breed*.
2. Sampel susu dihomogenkan kemudian diambil dengan menggunakan pipet *breed* sebanyak 0,01 ml susu dan diteteskan di atas gelas obyek yang terletak tepat di atas kotak 1cm².

3. Sampel susu disebarakan di atas permukaan seluas 1 cm² dengan menggunakan kawat ose berujung siku-siku dan dikeringkan di udara selama 5-10 menit selanjutnya fiksasi dengan api Bunaken

4. Pewarnaan *breed*

- Gelas obyek direndam dalam eter alkohol selama 2 menit dan goyang-goyangkan untuk melarutkan lemak susu.
- Pewarnaan dengan *methylen blue* dengan cara meneteskan di atas preparat susu.
- Dimasukkan ke dalam larutan alkohol 96% untuk menghilangkan sisa zat warna yang tidak melekat.
- Jumlah sel somatik dihitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x
- Jumlah sel somatik dihitung sebanyak 10 lapang pandang yang dirata-rata= A
- Jumlah sel somatik yang terdapat dalam 1 ml susu dihitung dengan terlebih dahulu mengetahui diameter lapang pandang mikroskop yang digunakan. Dengan rumus sebagai berikut = $\pi r^2 / 100$

Karena susu disebarakan seluas 1 cm² sebanyak 0,01 ml, maka jumlah sel somatik per ml susu adalah : $= \pi r^2 / 100 \times 0,01 \times A$

Jumlah sel somatik	Jenis mastitis
0 – 200.000	Negative
150.000 – 500.000	Subklinis

	tingkat 1
400.000 – 1.500.000	Subklinis tingkat 2
800.000 – 5.000.000	Subklinis tingkat 3
≥ 5.000.000	Klinis

6. Pengujian Alat Deteksi Mastitis (M-KID)

Susu sample/mastitis sebanyak 1 ml di masukkan ke dalam alat deteksi mastitis yang berbentuk jam pasir. Kemudian di masukkan biosurfktan sebanyak 1 ml ke dalam alat. Lalu lakukan homogenisasi dengan cara alat di goyang-goyangkan. Setelah itu putar alat 180° seingga larutan susu dan biosurfaktan akan turun dengan perlahan yang kemudian di ukur waktu penurunan susu tersebut hingga habis dengan alat penghitung waktu atau stopwatch.

Tabel standar uji M-KID dengan reagen biosurfaktan

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil karakterisasi terhadap isolat bakteri asal susu (Tabel 1) menunjukkan bahwa isolat bakteri yang digunakan adalah jenis bakteri *Pseudomonas sp.*

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia

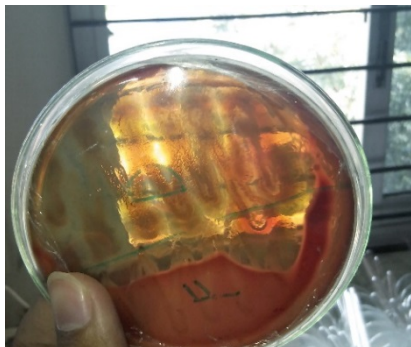
Uji Biokimia	I	M	V	S	TSIA	G	S	L	O	K
	n	R	P	i		l	u	a	k	a
	d			t		u	k	k	s	t
	o			r						
	l			a						

				t						
Ha sil	-	+	-	+	H ₂ S: -	-	-	-	+	+

Ket. : (+) menunjukkan hasil positif dan (-) menunjukkan hasil negatif

Menurut Jennings (2000) beberapa bakteri dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa biosurfaktan dan salah satunya adalah bakteri *Pseudomonas sp.* Uji verifikasi apakah bakteri *Pseudomonas sp* mampu menghasilkan biosurfaktan yaitu dengan menumbuhkan bakteri *Pseudomonas sp* pada media *Blood Agar Plate* (BAP), hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar isolat bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam dan hasil negatif tidak menunjukkan adanya zona bening. Zona bening terbentuk akibat proses hemolisis darah pada media BAP.

Gambar.1 Hasil Uji Skreening *Pseudomonas sp*



erikutnya isolat bakteri *Pseudomonas sp.* dilakukan kurva pertumbuhan bakteri yang berfungsi untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimal dari isolat bakteri *Pseudomonas sp.* agar ketika isolat berada dalam minimal media bakteri

dapat menghasilkan biosurfaktan yang optimal karena proses metabolisme yang masih berjalan dengan baik pada waktu pertumbuhan optimal. Perhitungan untuk mengetahui kurva pertumbuhan dilakukan dengan menghitung nilai absorbansi kultur bakteri pada panjang gelombang 610nm sedangkan penghitungan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan menghitung *Total Plate Count* (TPC). Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp* mulai memasuki fase stasioner pada jam ke-20 yaitu sebanyak $9,80 \times 10^8$ CFU/ml.

Hasil uji kualitas biosurfaktan yang dihasilkan dari *Pseudomonas sp* yang ditumbuhkan pada minimal media minyak kedelai dengan menggunakan uji *drop collapse* terbukti dapat memecah tegangan permukaan dalam waktu kurang dari 1 menit yaitu 1 detik. Biosurfaktan mampu memecah minyak karena mempunyai senyawa sifat aktif permukaan dan memiliki dua sisi yang saling berlawanan yaitu sisi hidrofilik dan hidrofobik. Hidrofilik artinya suka air, sifat hidrofilik ini cenderung untuk menyatu dengan air (polar) dan sisi hidrofobik yang artinya tidak suka air, dimana zat dengan sifat ini cenderung untuk menyatu dengan senyawa non-polar (Anandaraj, 2010).

Biosurfaktan yang dihasilkan kemudian diuji kelayakannya sebagai suatu bahan untuk mendeteksi penyakit mastitis. Standar minimal suatu alat atau reagen pendeteksi mastitis dinyatakan layak jika memiliki nilai uji diagnostik sebesar

85% pada nilai sensitivitas dan spesifisitas. Dibawah ini tabel uji diagnostik biosurfaktan dengan sampel susu :

Tabel 2. Uji diagnostik biosurfaktan terhadap sel somatik (gold standard)

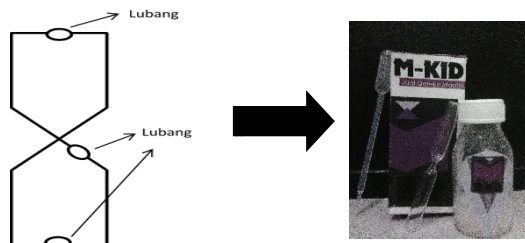
Gold Standard		Positif	Negatif	Jumlah
Jenis Uji	Positif	8	1	9
	Negatif	0	6	6
	Jumlah	8	7	15

Dari data di atas diketahui bahwa biosurfaktan mampu mendeteksi penyakit mastitis, dilihat dari reaksi positif yaitu berupa perubahan viskositas susu akibat kandungan sel somatik dalam susu yang tinggi, dan reaksi negative pada sampel susu dengan jumlah sel somatik di bawah 400.000. Dari data tersebut diperoleh nilai sensitivitas dari biosurfaktan 100% sedangkan spesifisitasnya 86%. Kemampuan biosurfaktan dalam mendeteksi mastitis dikarenakan susu mastitis pada sapi mengandung sel somatis yang terdiri dari 75% leukosit yang terdiri dari neutrophil, macrofag, limfosit, eritrosit, dan 25% sisanya adalah sel epitel. Struktur dinding sel somatik pada bagian luar tersusun dari senyawa kimia lipoprotein (gabungan dari senyawa lemak atau lipid dan senyawa protein) protein bersifat hidrofilik artinya suka air dan larut dalam air sedangkan lipid atau

lemak bersifat hidrofobik artinya tidak suka air dan tidak larut dalam air. Biosurfaktan memiliki sisi hidrofilik pada bagian kepalanya dan struktur senyawa kimia hidrofobik pada bagian ekornya, penambahan biosurfaktan pada susu yang diduga mastitis mengakibatkan menempelnya sisi hidrofobik biosurfaktan pada dinding luar sel somatik yang bersifat hidrofobik dan akan merusak membran sel somatik, hal ini terjadi akibat sel somatik kehilangan integritas struktur selnya sehingga yang terjadi adalah keluarnya DNA pada sel somatik dari inti sel kemudian DNA tersebut akan terkumpul menjadi satu dan terbentuk suatu gumpalan kental pada susu mastitis (Xia, 2006)

Desain yang sebelumnya dirancang kemudian di realisasikan dalam bentuk prototype M-KID (alat uji deteksi mastitis) yang berbahan dasar kaca pyrex. Dibentuk dengan tehnik pemanasan kaca dengan suhu tinggi yaitu diatas suhu 300⁰ C. Pipa kaca pyrex yang sudah dipanaskan dengan suhu diatas 300⁰ C kemudian dibentuk seperti bentuk jam pasir yang memiliki tinggi setiap tabungnya 5cm dan diameter setiap tabungnya 1cm. Kemudian pada tabung atas di buat 1 lubang yaitu pada bagian ujung atas sebagai tempat masuknya sampel susu dan biosurfaktan selain itu juga berfungsi sebagai masuknya udara agar alat M-KID dapat bekerja. Kemudian 2 lubang juga dibuat pada tabung bawah yaitu 1 lubang di bagian atas depan hampir mendekati bagian yang

menyempit sebagai udara keluar agar M-KID berfungsi, dan 1 lubang di bagian ujung bawah sebagai keluarnya atau pembuangan cairan sisa reaksi susu dan biosurfaktan. Berikut Gambar 1 design visual dan hasil realisasi bentuk yang berbahan dasar kaca pyrex.



Gambar 1. Alat uji diagnostik yang digunakan dalam M-Kid

Kemudian alat M-KID diuji kemampuan diagnostiknya dengan cara susu sample/mastitis sebanyak 1 ml di masukkan ke dalam alat deteksi mastitis yang berbentuk jam pasir. Kemudian di masukkan biosurfaktan sebanyak 1 ml ke dalam alat. Lalu lakukan homogenisasi dengan cara alat di goyang-goyangkan. Setelah itu putar alat 180° sehingga larutan susu dan biosurfaktan akan turun dengan perlahan yang kemudian di ukur waktu penurunan susu tersebut hingga habis dengan alat penghitung waktu atau stopwatch. Dari hasil uji diagnostik alat maka nanti akan terbentuk suatu model tabel standar uji M-KID yang nantinya dapat digunakan acuan dalam menggunakan alat tersebut untuk mendeteksi susu mastitis yaitu dengan melihat jumlah sel somatik, waktu penurunan cairan dalam alat M-KID, dan

sisa volume akhir pada tabung bagian atas jika dalam 1 menit cairan tidak dapat habis secara total. Dibawah ini tabel standar uji M-KID dengan reagen biosurfaktan yang didapatkan :

Tabel 3. Tabel standar uji M-KID dengan reagen uji biosurfaktan

Jumlah sel somatik	waktu (detik)	Sisa volume awal
100.000 – 200.000	1,4-2,9	-
250.000 – 300.000	4-5,6	-
350.000 – 400.000	6-7	-

4. KESIMPULAN

Isolat *Pseudomonas sp.* yang didapatkan mampu menghasilkan biosurfaktan yang nantinya biosurfaktan tersebut akan dijadikan reagen deteksi mastitis yang aman dan ekonomis. Biosurfaktan yang di hasilkan layak menjadi reagen deteksi mastitis dikarenakan memiliki nilai sensitivitas 100% dan Spesifisitas 85%. Prototype alat M-KID yang berbentuk seperti jam pasir terbukti dapat dijadikan alat bantu uji diagnostik mastitis pada sapi perah dengan cukup akurat, memiliki nilai ekonomis yang tinggi, minimalis, praktis, ramah lingkungan.

5. REFERENSI

Abouseoud, M., R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua, dan A. Nabi. 2008.

- Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas Fluorescens.* Desalination. 223: 143-15.
- Agung, Faizal. P, Rangga. S, Farras. D, Rizky E.P. W, Muhammad. 2012. *MASTECH(Mastitis Detection Technology): Metode Deteksi Mastitis Menggunakan Biosurfaktan asal Pseudomonas sp.*
- Anandaraj, B and P.Thivakaran. 2010. *Isolation and Production of Biosurfactant Producing Organism from Oil Spilled Soil.* *Journal Bioscient Technology*, vol 1 (3),2010,120-126 p.g. Department of Microbiology, Thanthai Hans Roever College, Peramabalur – 621 212. Tamilnadu., India.
- Andrews, A.H. 2000. *The Health of Dairy Cattle.*Blackwell Publishing. USA.
- Blood, D.C. and J.A. Henderson. 2007. *Disease Associated with Bacteria.* In : E. H. Marth and J.L Steele. *Veterinary Medicine. A Textbook of the Disease* Bailliere Tindall, London
- Dodd, F.H. and J.M. Booth. 2001. *Mastitis and Milk Production.* In : E. H. Marth and J.L Steele. *Applied Dairy Microbiology.* 2nd ed. Marcell Dekker Inc. USA.
- Morin, D.E. and W.L. Hurley. 2003. *Mastitis Lesson B.* University of Illinois, USA
- Parra, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles and M. P. Bosch. 1989. *Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactant.* *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 141-145.
- Prescott, L.M, P.H. John. and A.K. Donald. 2003. *Microbiology.* McGraw Hill Higher
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly and F.C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Blackwell Science Ltd. UK. 63.
- Rahayu, K. dan S. Sudarmadji. 1989. *Mikrobiologi Pangan, Fermentasi Pangandari Protein Hewani.* PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Roosena, Yusuf. 2010. *Kandungan protein susu sapi perah friesland holstein akibat pemberian pakan yang mengandung tepung katu (Sauropus androgynus (L.) Merr) YANG BERBEDA.* Samarinda: Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman
- Ruegg, P.L. 2002. *Milk Quality Test.* <<http://www.uwex.edu/MilkQuality/>

PDF/milk%20quality%20tests01.pdf
> Tanggal akses 13/08/2014.

Salasia, S.I.O., Z. Khusnan, C. Lämmler and M. Zschöck. 2004. *Comparative studies on phenotypic and genotypic properties of Staphylococcus aureus, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany*. J. Vet. Sci. 5 (2), 103-109

Subronto. 2003. *Ilmu Penyakit Ternak I*. Yogyakarta: Gadjah Mada Univ Press.

Sudono, A. Rosdiana, F. R, Setiawan, R. S. 2003. *Beternak Sapi Perah Secara Intensif*. AgroMedia Pustaka. Jakarta

Sudarwanto, M., H. Latif and M. Noordin. 2006. *The relationship of the somatic cell counting to sub-clinical mastitis and to improve milk quality*. The 1st International AAVS Scientific Conference. Jakarta, July 12-13, 2006.

Xia, Stephen S. 2006. *The rheology of gel formed during the California Mastitis Test*. The University of Waikato. Thesis