

PERANAN HEMAGLUTININ *Staphylococcus aureus* DALAM PROSES ADHESI PADA SEL EPITEL AMBING SAPI PERAH

Role of Staphylococcus aureus Haemagglutinin in Adhesion Process on Udder Epithelial Cells

Mahdi Abrar¹, I Wayan Teguh Wibawan², Bambang Pontjo Priosoeryanto³, Mirnawati Soedarwanto⁴, dan Fachriyan Hasymi Pasaribu⁵

¹Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁵Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: kedokteranhewan61@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan hemagglutinin pada *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dalam proses adhesi. Uji adhesi pada sel epitel ambing dilakukan dengan menggunakan metode Valentine-Weiggand. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *S. aureus* yang memiliki hemagglutinin menunjukkan kemampuan adhesi yang jauh lebih baik (± 380 bakteri/20 sel) dibandingkan dengan yang tidak memiliki hemagglutinin (± 56 bakteri/20 sel).

Kata kunci: hemagglutinin, adhesi, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The objective of this research is to study the role of hemagglutinin in *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in the adhesion process. The adhesion test was done using Valentine-Weiggand method. The result shows that *S. aureus* having hemagglutinin has ability of adhesion with the average of 380 bacteria/20 sel while *S. aureus* that does not have hemagglutinin has the ability of adhesion with the average of 56 bacteria/20 cells.

Key words: hemagglutinin, adhesi, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Penyakit radang ambing yang dikenal sebagai mastitis masih tetap merupakan masalah utama dalam peternakan sapi perah karena menyebabkan kerugian yang cukup besar yang berhubungan dengan penurunan produksi susu, penurunan kualitas susu, penyingkiran susu, biaya perawatan dan pengobatan yang cukup tinggi, serta pengafkiran ternak lebih awal. Insidensi mastitis pada sapi perah di Indonesia sangat tinggi (85%) dan sebagian besar merupakan infeksi yang bersifat subklinis. Penyebab mastitis subklinis yang paling sering terdeteksi adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae*, dan *Escherichia coli* (Wibawan *et al.*, 1992).

Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus* merupakan bentuk mastitis terpenting pada peternakan sapi perah karena mikroorganismenya ini terdapat di semua tempat seperti kulit sapi, ambing yang sakit maupun yang sehat, lingkungan, pemerah, peralatan yang digunakan, air, dan udara. Infeksi *S. aureus* semakin sulit ditangani dengan antibiotik karena bakteri ini banyak yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. Di samping itu, pemakaian antibiotik akan menimbulkan masalah baru, yaitu adanya residu antibiotik di dalam susu atau pada olahannya (Sudarwanto *et al.*, 1992).

Untuk menghindari hal-hal tersebut, strategi baru harus segera diupayakan. Salah satu pendekatan pemecahan masalah di atas adalah mempelajari faktor-

faktor virulen lainnya yang paling bertanggung jawab terhadap patogenitas mikroba terutama dalam proses adhesi. Hemagglutinin merupakan salah satu komponen adhesin bakteri yang memperantarai perlekatan sel bakteri pada sel darah merah. Hubungan antara sifat hemagglutinin dan kemampuan bakteri untuk melekat pada sel inang telah diteliti pada berbagai spesies bakteri. Bakteri yang memiliki hemagglutinin dapat lebih mudah menempel pada permukaan mukosa. Hal ini telah dibuktikan pada beberapa spesies bakteri seperti *Streptococcus* Group B (SGB), *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* (Beuth *et al.*, 1988; Gattermann *et al.*, 1992; Wibawan *et al.*, 1993; Rupp *et al.*, 1995; Wahyuni, 1998). Hal yang sama juga ditemukan pada hemagglutinin yang terekspresi pada pili *Escherichia coli* yang mempunyai peran dalam proses adhesi pada sel epitel ambing (Abrar dan Amelia, 2000; Abrar, 2009).

Keberadaan hemagglutinin pada *S. aureus* diduga akan mempermudah bakteri ini untuk melakukan adhesi pada sel ambing. Berdasarkan fenomena ini maka dalam mempelajari patogenesa mastitis subklinis faktor virulen ini harus dipertimbangkan. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh adhesin hemagglutinin yang berperan dalam proses adhesi, mempunyai sifat imunogenitas yang tinggi serta dapat menginduksi *protective immun respons* sehingga dapat digunakan sebagai landasan dalam pengembangan vaksin untuk pencegahan mastitis subklinis pada sapi perah.

MATERI DAN METODE

Isolat Bakteri

Isolat *S. aureus* yang digunakan diperoleh dari kasus mastitis subklinis. Dua isolat yaitu *S. aureus* 101(SA 101) positif hemaglutinin dan *S. aureus* 3T1(SA 3T1) negatif hemaglutinin (Abrar, 2001).

Preparasi Antibodi Spesifik Hemaglutinin

Preparasi antibodi spesifik terhadap hemaglutinin diperoleh dengan cara menyuntikkan secara intravena hemaglutinin yang telah terikat pada sel darah merah ayam ke individu ayam yang sama (3x/minggu, selama 3 minggu berturut-turut). Hemaglutinin diperoleh dengan cara mencampur sebanyak 2 ml suspensi bakteri yang positif pada uji hemaglutinasi dengan 2 ml *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 2%, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh didialisa terhadap akuades selama 3 hari pada suhu 4° C. Suspensi hemaglutinin ini dicampurkan dengan suspensi sel darah merah 2% (1:1). Kemudian preparasi diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam untuk memberi kesempatan pengikatan hemaglutinin oleh sel darah merah. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan sedimen disuspensikan dalam 5 ml PBS. Suspensi siap digunakan sebagai antigen. Serum dipanen setelah 1 minggu penyuntikan terakhir dan spesifitas antibodi diuji dengan imunodifusi *agar gel precipitation* (AGP).

Agar Gel Precipitation Test (AGPT)/Imunodifusi Ganda

Untuk membuat media agar, ke dalam sebuah tabung Erlenmeyer dicampur 0,4 gram agarose (Serva, Heidelberg, Jerman) dan 1,2 gram *polyethyleneglycol* (PEG 6000, Serva) yang kemudian dilarutkan dalam 20 ml akuades dan 20 ml *phosphate buffer saline* (PBS) 0,5 ml, pH 7,2. Suspensi ini ditangas pada air mendidih sehingga campuran ini larut secara sempurna. Setelah larut, campuran tersebut diturunkan dari penangas sampai suhu agak dingin. Dengan menggunakan pipet ukur 10 ml, agar cair dituangkan pada enam buah gelas objek yang telah diatur pada rak untuk AGP dan ditunggu sampai mengeras. Pada agar ini dibuat sumur-sumur untuk antigen dan antisera homolognya dengan menggunakan *gel puncter*. Ke dalam bagian tengah sumur tersebut diisikan antisera, sedangkan antigen-antigen yang diuji dimasukkan pada sumur-sumur yang mengelilinginya. Rak yang berisi gelas objek kemudian ditaruh pada tempat yang telah diberi kertas saring basah untuk menjaga kelembabannya. Reaksi ini dibaca setelah 18-48 jam dengan melihat garis presipitasi pada daerah antigen dan antisera yang homolog. Preparasi antigen dilakukan dengan menggunakan ekstraksi *autoclaf*. Bakteri ditumbuhkan dalam 50 ml *todd hevn broth* (THB) (Gibeo, Karlsruhe, Jerman) dalam inkubator pada suhu 37° C selama 18-24 jam, kemudian disentrifus 15.000 rpm selama 10 menit.

Pelet dicuci sebanyak dua kali dengan 5 ml natrium klorida (NaCl) 0,14 M. Pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan 0,35 ml NaCl 0,14 M, dihomogenkan dan dinetralkan dengan menggunakan natrium hidroksida (NaOH) 0,1 N hingga suspensi berwarna merah jambu/merah. Suspensi selanjutnya diautoclaf selama 15 menit pada 120° C, disentrifus selama 10 menit, 15.000 rpm dan supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai antigen.

Pembuatan Biakan Sel Epitel Ambing Sapi

Sebanyak 40 ml susu dari ambing sapi diperah dengan tangan secara aseptis langsung ke dalam tabung sentrifus plastik steril berukuran 50 ml (Corning, USA) yang sebelumnya telah diisi 10 ml media transpor *dulbecco's modified eage's medium* (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland); 10% natrium bikarbonat (Gibco); 0,1% fungizon (Gibco); dan 0,1% gentamisin (Gibco). Pemisahan sel epitel dari susu dilakukan dengan sentrifugasi pada suhu 4° C, 100 rpm selama 10 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan DMEM sebanyak tiga kali. Sel dalam pelet dihitung menggunakan hemositometer Neubeur, kemudian ditumbuhkan dalam *tissue culture flask* berukuran luas 25 cm² (Costar Cambridge, MA, USA) dengan kepadatan 5 x 10⁵ sel/ml dalam medium DME yang disuplementasi dengan 30% *fetal calf serum* (FCS, Flow Laboratories); 0,1% gentamisin; dan 0,1% fungizon. Sel tersebut diinkubasi pada suhu 37° C, dalam inkubator CO₂ (Jouan, France). Pola pertumbuhan sel, koloni serta morfologinya diamati setiap hari menggunakan menggunakan mikroskop fase kontras (Zeiss, Germany).

Uji Adhesi

Sebanyak 1 ml suspensi bakteri *S. aureus* baik yang positif hemaglutinin maupun yang negatif (mengandung 10⁸ sel bakteri) disuspensikan dengan *fluorescen isothiocianat* (FITC) dan diinkubasikan pada suhu ruangan selama 60 menit. *Fluorescen isothiocianat* yang tidak terikat dicuci dengan menggunakan *minimum essential medium* (MEM) sebanyak 2-3 kali. Bakteri yang telah terlabel oleh FITC disuspensikan dengan sel epitel ambing sapi perah dengan konsentrasi 10⁵ sel/ml dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 60 menit. Bakteri yang tidak menempel pada sel epitel dicuci dengan MEM sebanyak 2-3 kali. Kemampuan adhesi ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang menempel pada 20 sel epitel. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x (Valentin-Weigand *et al.*, 1988).

Uji Hambat Adhesi

Untuk uji hambat adhesi ini sebanyak 0,5 ml sel bakteri (10⁸ sel/ml) yang telah terlabel FITC di inkubasikan terlebih dahulu dengan 100 µl antiserum spesifik terhadap hemagutinin sebelum diinkubasikan dengan sel epitel ambing. Penentuan jumlah adhesi bakteri dihitung di bawah mikroskop fluoresen seperti yang dilakukan pada uji adhesi di atas.

Analisis Data

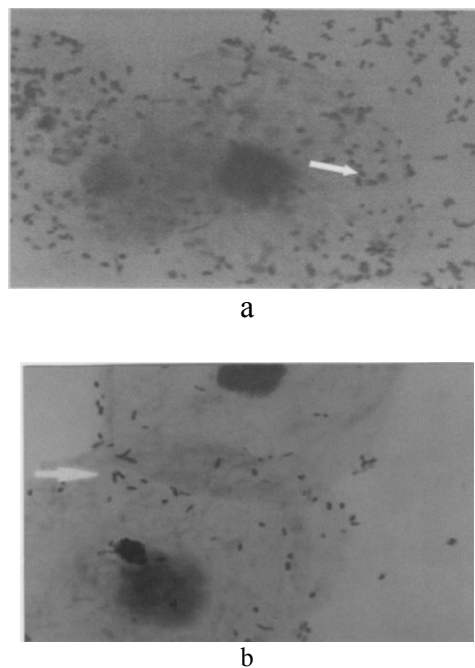
Untuk melihat adanya perbedaan kemampuan adhesi dari dua kandidat bakteri yang memiliki sifat hemaglutinin yang berbeda digunakan uji T.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan adhesi bakteri pada permukaan sel inang adanya hubungannya dengan peranan antigen permukaan untuk melekat pada reseptor permukaan baik yang spesifik maupun yang tidak spesifik. Pada adhesi yang bersifat spesifik, perlekatan bakteri diperantarai oleh reseptor permukaan sel inang yang mampu berkaitan dengan antigen permukaan bakteri. Pada perlekatan yang bersifat tidak spesifik diduga tidak melibatkan peranan reseptor permukaan. Antigen permukaan ini secara umum disebut adhesin dan dapat berupa *fimbrae*, pili, kapsul, atau komponen struktural bakteri lainnya (Wibawan dan Laemmalder, 1992; Wibawan *et al.*, 1993). Keberadaan hemaglutinin pada permukaan bakteri sangat menentukan proses adhesi. Bakteri yang tidak memiliki hemaglutinin maka kemampuan adhesinya akan lemah. Hal ini sangat memengaruhi patogenitas dari bakteri itu sendiri karena adhesi merupakan tahap awal dari proses infeksi.

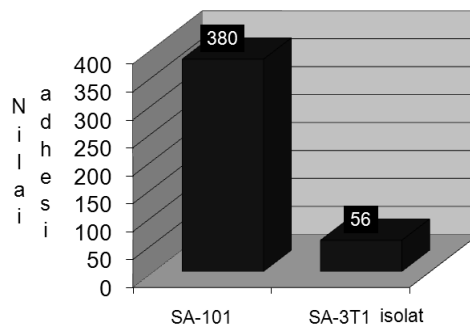
Pada kasus mastitis subklinis yang disebabkan oleh *S. aureus* jalannya infeksi ini biasanya melalui mukosa kelenjar ambing. Patogenesis infeksi bakteri ini pada kejadian mastitis subklinis belum diketahui secara sempurna. Diduga infeksi dimulai oleh keberhasilan bakteri menembus lapisan mukosa, lalu dilanjutkan oleh proses adhesi dan kolonisasi. Tampaknya kemampuan adhesi dan kolonisasi bakteri pada sel epitel merupakan tahap kritis untuk keberhasilan infeksi. Keberadaann hemaglutinin yang tinggi pada isolat *S. aureus* asal sapi mastitis subklinis pada penelitian ini memberikan indikasi bahwa hemaglutinin berperan penting dalam proses adhesi bakteri ke permukaan sep epitel.

Kemampuan sifat adhesif bakteri pada sel epitel ambing, dipelajari dengan menggunakan 2 isolat bakteri, yakni satu isolat memiliki hemagutinin SA 101 dan satu isolat tidak memiliki hemaglutinin SA 3T1. Pemilihan isolat-isolat ini berdasarkan pada ekspresi fenotipe, karakter permukaan dan kemampuan bakteri untuk mengaglutinasi eritrosit dari berbagai hewan (Abrar, 2001). Pemeriksaan terhadap kapasitas adhesi bakteri *S.aureus* pada epitel ambing sapi menunjukkan bahwa adanya perbedaan kemampuan untuk melekat pada sel epitel ambing sapi. Kemampuan *S. aureus* yang memiliki hemaglutinin ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan *S.aureus* yang tidak memiliki hemaglutinin. Berdasarkan uji T, tampak bahwa banyaknya sel epitel pada hemaglutinin positif berbeda sangat nyata dengan banyaknya sel epitel pada hemaglutinin negatif (P=0,0001). *Stahphylococcus aureus* 101 menunjukkan kemampuan adhesi jauh lebih besar (380 bakteri/20 sel) dibandingkan dengan 3T1 yang tidak memiliki hemaglutinin (56 bakteri/20 sel) seperti yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Adhesi *S.aureus* 101(a) dan 3 T1(b) pada permukaan biakan sel epitel ambing sapi menggunakan teknik pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) 100x

Kemampuan adhesi ini berkaitan dengan keberadaan hemaglutinin di permukaan sel bakteri disajikan pada Gambar 2.



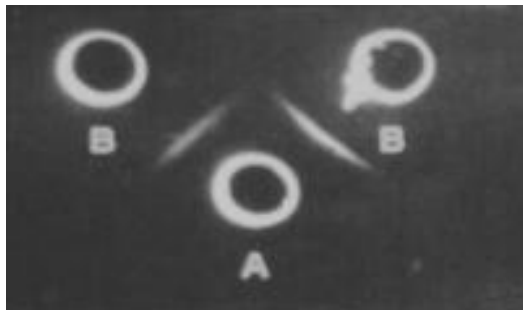
Gambar 2. Hubungan antara keberadaan hemaglutinin pada bakteri *S.aureus* dengan nilai adhesi pada permukaan sel epitel ambing

Pada kasus mastitis subklinis pada sapi perah, adhesi adalah tahap awal infeksi yang sangat penting dan menentukan. Adhesi merupakan tahap inisiasi dari proses kolonisasi bakteri. Adhesi bakteri ini pada permukaan sel epitel ambing diduga bersifat spesifik, artinya proses tersebut diperantarai oleh reseptor hemaglutinin pada permukaan sel epitel ambing yang berikatan secara khas dengan hemaglutinin pada permukaan sel bakteri.

Protein serupa telah dijumpai pada beberapa bakteri patogen lainnya, seperti pada *Pasteurella multocida*, yakni protein hemaglutinin berfungsi pada proses perlekatan bakteri pada sel epitel trakea (Darmawati, 1998). Pada bagian lain dilaporkan bahwa protein hemaglutinin juga dapat ditemukan pada bakteri *Vibrio cholerae* biotype *El Tor*, *Salmonella Typha*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* Group B (SGB) (Wahyuni,

1998) dan *Escherichia coli* (Abrar dan Amelia, 2000; Abrar, 2009). Semua bakteri tersebut masing-masing memfungsikan protein hemaglutinin untuk melekat pada sel epitel usus halus, eritrosit tikus, permukaan sel epitel trakea, pada sel Hella, dan sel epitel ambing.

Untuk mengetahui fungsi hemaglutinin dalam proses adhesi dilakukan uji hambat adhesi dengan menggunakan serum spesifik ekstrak hemaglutinin. Serum spesifik terhadap hemaglutinin diperoleh dengan cara menyuntik ayam dengan hemaglutinin yang telah ditempelkan pada permukaan eritrosit ayam itu sendiri. Ayam akan membentuk antibodi spesifik hanya terhadap hemaglutinin yang menempel pada permukaan eritrosit tetapi tidak terhadap eritrositnya sendiri. Serum yang dipanen menunjukkan reaksi spesifik terhadap ekstrak bakteri yang memiliki hemaglutinin pada uji imunodifusi (Gambar 3).



Gambar 3. Reaksi imunodifusi yang memperlihatkan garis presipitasi pada daerah antibodi spesifik hemglutinin *S. aureus* (A) dan antigen *S. aureus* (B)

Sel epitel ambing dipreinkubasikan dengan ekstrak hemaglutinin sebelum diinkubasikan dengan bakteri yang memiliki hemaglutinin. Ternyata hambatan adhesi dapat ditampilkan dengan jelas. Hal ini menunjukkan peran hemaglutinin dalam proses adhesi perlu diperhitungkan.

Uji hambat adhesi bakteri *S. aureus* 101 dengan menggunakan antiserum spesifik terhadap hemaglutinin menunjukkan penurunan kemampuan adhesi. Penurunan kemampuan adhesi ini tidak terjadi apabila dalam uji hambat ini digunakan serum normal. Hal ini berarti bahwa reseptor dari eritrosit yang digunakan substansi yang menyerupai antiserum spesifik terhadap hemaglutinin tersebut. Antibodi pada *S. aureus* 101 menghambat perlekatan *S. aureus* 101 pada permukaan sel epitel ambing. Efek penghambatan dari antiserum *S. aureus* 101 adalah disebabkan karena adanya antibodi terhadap adhesin protein pada permukaan sel bakteri. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa antibodi spesifik dapat mencegah adhesi *S. aureus* pada sel epitel ambing. Preinkubasi bakteri-bakteri yang memiliki hemaglutinin *S. aureus* dengan antiserum hemaglutinin yang homolog mampu menurunkan nilai adhesi pada permukaan sel. Hal ini menunjukkan bahwa hemaglutinin sebagai adhesin mampu dihambat aktivitasnya secara spesifik oleh antiserum yang homolog.

Dari hasil pengamatan, diketahui bahwa hemaglutinin merupakan tanda (*marker*) bagi bakteri yang sangat mengandalkan kemampuan adhesi dalam mempertahankan-

kan hidupnya. Hemaglutinin pada *S. aureus* penyebab mastitis subklinis pada sapi dipercaya sebagai salah satu faktor virulensi, yakni hemaglutinin ini bertanggung jawab terhadap adhesi secara spesifik bakteri pada sel-sel epitel ambing. Seperti yang telah diuraikan di atas, pada jenis bakteri lain, hemaglutinin telah diketahui sebagai salah satu faktor yang bertanggung jawab terhadap sifat adhesivitas bakteri pada permukaan sel inang. Pada kasus mastitis sifat adhesif sangat dibutuhkan oleh bakteri agar bakteri tidak mudah terbawa oleh susu pada saat pemerahan. Penelitian ini memberikan indikasi bahwa hemaglutinin berperan pula dalam proses adhesi bakteri pada permukaan sel epitel ambing.

KESIMPULAN

Hasil pemeriksaan terhadap kapasitas adhesi bakteri *S. aureus* pada epitel ambing sapi menunjukkan bahwa adanya perbedaan kemampuan untuk melekat pada sel epitel ambing sapi. Kemampuan *S. aureus* yang memiliki hemaglutinin ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan *S. aureus* yang tidak memiliki hemaglutinin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M. dan Amelia. 2000. Distribusi hemaglutinin pada *Escherichia coli* isolat asal feses sapi dan babi serta perannya dalam adhesi. **Seminar Nasional VI Perhimpunan Alumni dari Jepang (Persada), Bogor.**
- Abrar, M. 2001. Distribusi Hemaglutinin pada *Staphylococcus aureus* Asal Sapi Mastitis Subklinis. **Disertasi.** Sekolah Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Abrar, M. 2009. Peranan hemaglutinin *Escherichia coli* dalam proses adhesi. **Jurnal Kedokteran Hewan.** 3(1):194-198.
- Beuth, J.H., I.K.F.S. Perdreu, G. Peters. P. Hezcko, and G. Pulveer. 1988. Hemagglutination by *Staphylococcus saprophyticus* and other coagulase-negative Staphylococci. **Microbiol. Path.** 4:379-383.
- Darmawati, S. 1998. Karakterisasi Protein Hemaglutinin Subunit Pili *Pasteurella multocida* Serotype B:2. **Tesis.** Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Gattermann, S.H., G.W. Meyer, and G. Wanner. 1992. Staphylococcus saphrophyticus hemaglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. **Infect. Immun.** 60:4127-4132.
- Rupp, ME., N. Sloat, H.G.W. Meyer, J. Han, and S. Gattermann. 1995. Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.** 172:1509-1518.
- Sudarwanto, M.A.W., Sanjaya, dan T. Purnawarman. 1992. Residu Antibiotik dalam Susu Pasteurisasi Ditinjau dari Segi Kesehatan Masyarakat Veteriner. **Laporan.** Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Valentine-Weigand, PGS. Chhatwall, and H. Blobel. 1988. Adherence of streptococcal isolates from cattle and horses to their respective host epithelial cells. **Am. J. Vet. Res.** 49:1485-1488.
- Wahyuni, A.E.T.H. 1998. Peran Hemaglutinin *Streptococcus agalactiae* dalam Proses Adhesi pada Sel Epitel Ambing Sapi. **Tesis.** Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wibawan, I.W.T. and C. Lämmler. 1992. Relationship between group B streptococcal serotypes and cell surface hydrophobicity. **J. Vet. Med.** 39:376-382.
- Wibawan, I.W.T., C. Lämmler, 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., C. Lämmler, and F.H. Pasaribu. 1993. A hemagglutinating adhesion of group B Streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediated adherence to HeLa cell. **J. Gen Microbiol.** 139:2173-2180.
- Wibawan, I.W.T., C. Lämmler, and F.H. Pasaribu. 1997. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. **J. Gen Microbiol.** 138:1237-1242.