KARAKTERISASI FAKTOR VIRULEN *Streptococcus* sp. GRUP C ASAL WABAH PADA KERA DAN BABI DI BALI DAN BEBERAPA DAERAH DI INDONESIA

VIRULENT FACTORS CHARACTERIZATION OF *Streptococcus* sp. GROUP C ISOLATED FROM MONKEYS AND PIGS AT BALI AND OTHER COUNTRIES IN INDONESIA

I WayanTeguh Wibawan[2], Eko Sugeng Pribadi[3], Hernomoadi Huminto[2], Sri Estuningsih[2] dan Bambang Pontjo Priosoeryanto[2]

[2]Laboratorium Patologi Veteriner, Bagian Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA, Telp./Faks. (62-251-329539), E-mail: patoipb@indo.net.id
[3]Laboratorium Mikologi, Bagian Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA

ABSTRAK

Media Veteriner. 1998. 5(4): 7-11

Sejumlah 27 isolat bakteri streptokokus grup C (SGC) asal hewan babi dan kera dari Bali, tiga isolat SGC asal hewan babi dari Lampung (Sumatera Selatan) dan dua isolat SGC asal hewan babi dari Maros (Sulawesi Selatan) telah diisolasi dan berdasarkan sifat biologi dan uji biokimiawi bakteri ini digolongkan ke dalam *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Dari 32 isolat SGC yang diperiksa ternyata 28 isolat memiliki bentuk koloni besar dan beraspek mukoid/lendir dan empat isolat SGC dari babi menunjukkan bentuk koloni kecil dan kasar. Berdasarkan pemeriksaan SDS-PAGE, diperoleh data bahwa seluruh isolat SGC memiliki protein hidrofobik dan hanya 10 isolat menunjukkan aktivitas haemaglutinasi.

Kata-kata Kunci : *Streptococcus* sp., SGC, faktor virulen

ABSTRACT

Media Veteriner. 1998. 5(4): 7-11

Twenty seven isolates of group C streptococcus (SGC) originated from pigs and monkeys from Bali, three SGC isolates of pigs from Lampung and two SGC isolates of pigs from Maros were re-isolated and identified as *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* based on their biological characteristics and biochemical reactions. Of the 32 SGC isolates investigated, 28 SGC isolates formed large and mucoid colonies in the blood agar while four isolates had small and rough colonies. Using SDS-PAGE test, hydrophobic proteins were detected from all SGC isolates, while only 10 isolates expressed the haemagglutination activities.

Key Words : *Streptococcus* sp., SGC, virulent factors

PENDAHULUAN

Streptococcus sp. Grup C sebagai penyebab wabah pada kera dan babi di Bali, Sumatera Utara, Tanjungkarang, Manado, dan Flores telah dilaporkan. Di Bali wabah telah terlihat di semua kabupaten dan menyerang semua ras babi. Angka morbiditas mencapai 50 % dan mortalitas 45 %. Namun data penyakit yang menyerang masih sulit diperoleh (Dartini *et al.*, 1994, Dharma, 1994, Rudiyanto dan Dharma, 1994, Soeharsono dan Dibia, 1994).

Secara serologis *Streptococcus sp.* yang menyerang babi dan kera mempunyai kesamaan antigen permukaan. Diduga bahwa ada kemungkinan *Streptococcus sp.* grup C ini memiliki potensi sifat zoonosis yang membahayakan terutama di daerah-daerah pariwisata seperti Bali (Wibawan dan Pasaribu, 1994). Potensi demikian amat tergantung adanya faktor virulen yang dimiliki oleh bakteri bersangkutan. Faktor-faktor tersebut dapat dikaji keberadaanya yang meliputi berbagai sifat antigen permukaan serta berbagai jenis hasil metabolit biakan bakteri seperti enzim dan toksin.

Dari hasil penelitian pendahuluan dapat diketahui bahwa SGC penyebab wabah penyakit pada babi dan kera ini tergolong ke dalam *Streptococcus zooepidemicus.* Bakteri ini menunjukkan gambaran β-hemolise yang jelas di media darah. Pertumbuhan koloninya di agar darah dan agar lunak bila dibandingkan dengan sifat *Streptococcus sp.* grup B menunjukkan adanya kecenderungan pembentukan kapsul (Wibawan dan Pasaribu, 1994). Dari pustaka diketahui bahwa bakteri ini bisa diisolasi dari berbagai induk semang (Rolle dan Mayr 1984, Blobel dan Schliesser 1980).

Sebagian dari materi artikel ini telah dipresentasikan di Seminar Nasional Primatologi di Bali, Universitas Udayana, tanggal 18-19 Februari 1998.

BAHAN DAN METODE

Karakterisasi Fenotipik Isolat

Dari isolat *Streptococcus sp.* grup C yang telah terkumpul, evaluasi diadakan terhadap karakteristik fenotipik dari morfologi koloni, sifat pertumbuhan pada media cair dan agar lunak, kemampuan hemolisis, dan sifat hidrofobisitas dari komponen permukaan sel bakteri. Untuk uji komponen permukaan sel, yang diterapkan adalah uji agregasi garam, uji perlekatan heksadekan dan teknik kromatografi (Wibawan *et al.*, 1993, Wibawan *et al.*, 1992). Ciri-ciri karakteristik fenotip SGC yang teramati dikaitkan dengan tingkat virulensi yang bersangkutan. Sehingga dengan melihat ciri fenotip SGC tertentu dapat diketahui sifat ganas kuman ini.

Isolasi Faktor Virulen

Antigen Permukaan dan Dasar Pembentukan Kit Diagnostik

Untuk melihat perbedaan profil antigen permukaan SGC ganas dan tidak ganas maka dipilih empat isolat SGC dari masing-masing kriteria di atas. Ekstraksi antigen permukaan dilakukan dengan metode otoklaf dan enzimatik. Profil antigen dievaluasi dari band SDS-PAGE yang terlihat dan profil antigen dibandingkan dari setiap cara ekstrasi. Peran antigen permukaan pada perlekatan ditentukan dengan uji hambat perlekatan .

Apabila ditemukan *antigen pembeda* antara isolat ganas dan tidak ganas maka antigen ini dapat digunakan sebagai agen penginduksi antiserum spesifik. Antisera ini selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan pembuatan kit diagnostik. Kit diagnostik dibuat dengan memanfaatkan sifat protein A yang terdapat pada permukaan *Staphylococcus aureus* strain Cowan I yang mampu mengandeng fraksi Fc antibodi spesifik tadi. Reaksi positif ditandai dengan adanya bentuk aglutinasi bila preparasi antigen dicampur dengan suspensi antisera.

Hemaglutinin dan Protein Hidrofobik

Hemaglutinin pada permukaan sel bakteri mampu untuk mengaglutinasi eritrosit. Perlekatan bakteri pada permukaan epitel mukosa diduga berkaitan dengan keberadaan hemaglutinin. Uji yang diterapkan adalah test perlekatan. Sifat hidrofobik atau hidrofilik diuji dengan uji agregasi garam dan uji perlekatan heksadekan.

Untuk proses isolasi dan identifikasi hemaglutinin dan protein hidrofobik digunakan kromatografi memakai phenylsepharose dan DEAE-Sephacel (Wibawan *et al.* 1992). Hasil isolasi digunakan pada uji hambat perlekatan sehingga peran ke dua protein di atas dalam proses perlekatan diketahui.

Sifat Perlekatan dan Antifagositik

Infeksi bakteri diawali dengan proses perlekatan kuman pada sel mukosa kemudian dilanjutkan dengan kolonisasi. Bila suatu penyakit menunjukkan tanda sepsis maka berarti bakteri tersebut mampu menembus sel-sel endotel pembuluh darah dan memungkin bakteri dan toksinnya dapat diisolasi dari darah perifer. Pada tahap ini bakteri harus mampu menghadapi aktifitas mikrofag (PMN). Untuk mempelajari sifat adhesivitas dan antifagositik maka dua isolat ganas dan dua isolat tidak ganas dipilih untuk uji perlekatan dan fagositosis.

a. Uji Perlekatan

Uji perlekatan digunakan untuk melihat kemampuan melekat sel bakteri pada permukaan sel mukosa. Uji ini dapat secara kwantitatif (Wibawan *et.al.*, 1992).

b. Uji Fagositosis

Kapasitas fagositosis PMN terhadap bakteri dapat dimodifikasi oleh antigen permukaannya. Peran polisakarida dan streptolisin sebagai faktor antifagositik dapat ditentukan pada uji ini (Wibawan dan Lämmler, 1992).

Seleksi Kandidat Vaksin

Pemilihan kandidat vaksin dilakukan berdasarkan atas hasil evaluasi dari berbagai faktor virulen yang telah didapat. Respon immunologisnya pada hewan percobaan ditentukan secara kwantitatif dengan Agar gel presipitasi. Uji tantang dengan isolat lapang ganas juga dilakukan terhadap induk semang yang telah divaksinasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejumlah 27 isolat bakteri streptokokus grup C (SGC) asal hewan babi dan kera dari Bali, tiga isolat SGC asal hewan babi dari Lampung (Sumatera Selatan) dan dua isolat SGC asal hewan babi dari Maros (Sulawesi Selatan) telah dapat diisolasi dan diterakan pada Tabel 1. Seluruh isolat mampu menghemolisis darah dan memiliki hemolisis tipe beta, menunjukkan reaksi spesifik dengan antiserum grup C dan tidak bereaksi dengan antisera grup A, B, D, G dan L. Berdasarkan atas uji biokimiawi, terutama kemampuan bakteri ini memfermentasi sorbitol tetapi tidak memecah trehalose, maka bakteri ini kemudian digolongkan ke dalam *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus.*

Contoh untuk isolasi kuman diambil dari hewan yang secara klinik tampak sakit, dengan mengambil darah perifer dan dari beberapa organ tubuh apabila hewan (babi atau kera) tersebut mati. Dari darah perifer babi yang sedang sakit sering diperoleh kuman SGC dalam keadaan murni tanpa diikuti oleh infeksi bakteri lain. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri SGC bersifat invasif dan mampu menyebabkan septikemia dan kadang-kadang meningitis. Pengamatan klinik pada hewan jenis lain (domba, kambing, kerbau, kuda dan sapi) di daerah wabah telah dilakukan dan ternyata tidak ada yang menderita penyakit sebagai akibat infeksi bakteri ini. Meskipun di daerah wabah tidak diamati adanya kasus pada hewan-hewan tadi, dari beberapa literatur diketahui bahwa *S. equi subsp. zooepidemicus* ini tidak bersifat *host specific*, artinya bisa menyerang berbagai jenis hewan (Devriese, 1991; Oikawa *et al.*, 1994).

Dari 32 isolat SGC yang diperiksa ternyata 28 isolat memiliki bentuk koloni besar dan beraspek mukoid/lendir dan empat isolat SGC dari babi menunjukkan bentuk koloni kecil dan kasar. Bentuk koloni bakteri ini ternyata berkaitan dengan pola pertumbuhan dalam media cair dan agar lunak.

Tabel 1. Tempat Isolasi dan Beberapa Sifat SGC Lapangan yang Diisolasi dari Beberapa Wilayah di Indonesia

Daerah asal Isolat	Jumlah	Grup	Tipe Hemolisis
Asal Babi :			
Jemberana	15	C	β
Tabanan	2	C	β
Denpasar	3	C	β
Bangli	2	C	β
Kelungkung	1	C	β
Lampung	3	C	β
Maros	2	C	β
Isolat asal Kera:			
Sangeh	2	C	β
Ubud	1	C	β
Alas Kedaton	1	C	β

Semua isolat yang menunjukkan koloni mukoid tumbuh keruh di media cair dan difus dalam agar lunak, sedangkan isolat dengan koloni kecil dan kasar tumbuh dalam bentuk sedimen dengan supernatan jernih pada media cair serta berkoloni kompak dalam agar lunak (Tabel 2; Gambar 1). Hasil serupa telah diamati pula pada streptokokus grup B dan D (Wibawan dan Lämmler, 1990; 1992). Bentuk pertumbuhan bakteri dapat digunakan untuk menentukan keberadaan kapsul pada bakteri streptokokus. Keberadaan kapsul yang dikaitkan dengan bentuk pertumbuhan bakteri SGC ini lebih lanjut ditegaskan dengan studi elektron mikroskop. Pola pertumbuhan bakteri keruh diduga berkaitan dengan formasi rantai bakteri yang umumnya lebih pendek (5-7 bakteri/rantai) dibandingkan dengan bakteri SGC yang tumbuh membentuk sedimen (>20 bakteri/rantai). Bentukan rantai panjang bakteri menyebabkan pertumbuhan dalam bentuk sedimen.

Gambar 1. Bentuk Koloni Difus SGC Berkapsul (SGC 5.60 dan 6.29) dan Bentuk Koloni Kompak SGC Tidak Berkapsul (MAS B).

Bentuk koloni bakteri difus diduga berkaitan dengan kemampuan invasi bakteri ini pada jaringan tubuh inang dan hal ini dapat ditegaskan melalui penelitian yang dilakukan oleh Huminto *et al.* (1997). Dalam penelitian tersebut terlihat bahwa bakteri berkapsul dapat diisolasi dari darah perifer beberapa jam setelah inokulasi bakteri ini secara intraperitoneal dan ini tidak terjadi apabila menggunakan bakteri SGC yang tidak berkapsul. Kapsul bakteri SGC berperan sebagai salah satu faktor virulen bakteri ini.

Keberadaan kapsul dapat digunakan sebagai sebagai kriteria untuk menentukan keganasan bakteri. Secara tidak langsung keberadaan kapsul dapat diketahui dengan melihat pola pertumbuhan bakteri.

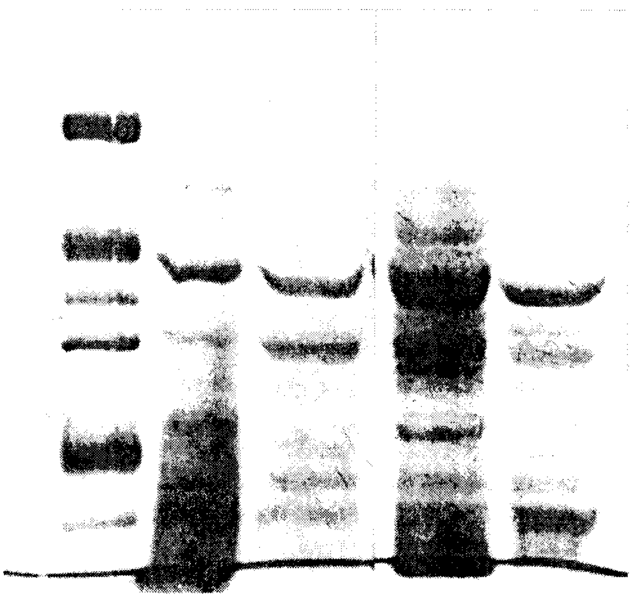
Tabel 2. Hubungan antara Bentuk Koloni dengan Beberapa Sifat Lain Bakteri SGC Isolat Babi dan Kera

Asal Isolat	n	Aspek Koloni	Bentuk THB	Pertumbuhan di Agar lunak	SAT	HAT
Kera	4	mukoid	keruh	difus	-	HPL
Babi	24	mukoid	keruh	difus	-	HPL
	4	kasar	sedimen	kompak	+	HPB

HPL=hidrofilik, HPB=hidrofobik

Untuk mengetahui peran kapsul dalam mekanisme infeksi, maka dilakukan uji perlekatan dan fagositosis. Dari penelitian ini ternyata kapsul bertanggung jawab terhadap sifat perlekatan dan mampu menahan penyingkiran bakteri oleh sel radang *polimorf* (PMN). Sebaliknya, bakteri yang tidak berkapsul kurang melekat dan mudah disingkirkan oleh PMN dalam proses fagositosis (Huminto *et al.*, 1997). Bakteri yang berkapsul pada umumnya lebih patogen dibandingkan dengan bakteri yang tidak berkapsul (Scanlan, 1988 dan Campo *et al.*, 1995). Kemampuan bakteri untuk bertahan dalam PMN diduga pula sangat penting artinya dalam proses invasi karena bakteri dapat menggunakan PMN sebagai *tumpangan* dalam penyebarannya tanpa perlu dianggap asing oleh sistem pertahanan tubuh.

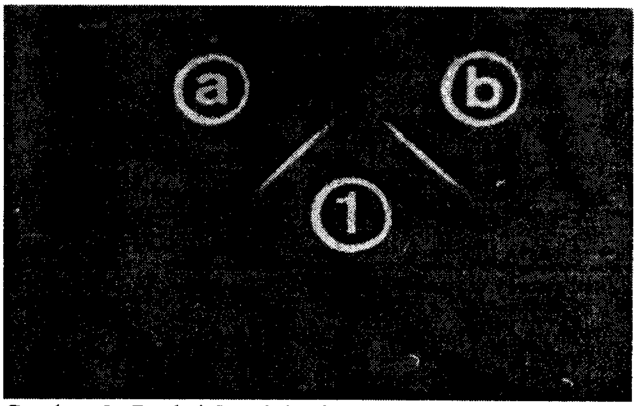
Sifat perlekatan bakteri SGC yang tidak berkapsul diduga diperantarai oleh komponen protein permukaan. Ikatan antara protein ini dengan sel epitel inang bersifat tidak khas, sehingga ikatan yang terjadi lebih lemah dibandingkan dengan ikatan yang khas. Ikatan yang tidak khas antara bakteri dengan sel epitel inang tidak melibatkan peran reseptor khas pada permukaan sel inang. Untuk mengetahui keberadaan protein permukaan ini dilakukan uji agregasi garam. Reaksi positif untuk SAT ditunjukkan oleh empat isolat SGC yang tidak berkapsul. Suspensi bakteri keempat isolat menggumpal dalam larutan amonium sulfat konsentrasi rendah (0,4 *M*), sedangkan SGC berkapsul tidak menunjukkan penggumpalan dengan larutan amonium sulfat konsentrasi tinggi (1,6 *M*). Selanjutnya, ternyata keempat isolat yang menunjukkan reaksi SAT positif ini memiliki sifat hidrofobik, artinya lebih menyukai fase hidrokarbon dibandingkan dengan fase air pada uji perlekatan heksadekan. Dengan menggunakan matriks hidrofobik (*phenyl-sepharose*) dapat diisolasi komponen protein hidrofobik ini baik dari SGC tidak berkapsul maupun SGC berkapsul. Protein hidrofobik terdiri dari beberapa komponen protein dengan berat molekul relatif rendah, hal ini dapat diketahui dengan melewatkan isolat protein hidrofobik ini pada SDS-PAGE (Gambar 2). Penampilan pita protein dilakukan dengan pewarnaan perak yang memperlihatkan protein hidrofobik ini dimiliki pula oleh SGC berkapsul, tetapi kapsul menutupi penampilan protein ini sehingga tidak terdeteksi oleh uji SAT dan HAT.



Gambar 2. Profil Protein Hidrofobik Streptokokus Grup C yang Berkapsul (SGC 5.60) dan yang Tidak Berkapsul (MAS B)

Komponen protein lain yang diduga turut berperan dalam dalam proses perlekatan adalah hemaglutinin. Ternyata hemaglutinin dapat terdeteksi pada 10 isolat dari 32 isolat SGC yang diuji. Antiserum khusus terhadap hemaglutinin SGC ini ternyata dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan hemaglutinin pada permukaan sel bakteri SGC (Gambar 3). Temuan yang menarik untuk dikaji lebih lanjut dalam penelitian mendatang adalah adanya reaksi silang antara antiserum hemaglutinin SGC dengan hemaglutinin dari streptokokus grup B. Hemaglutinin dapat dikatakan sebagai *common antigen* yang mungkin dimiliki oleh beberapa grup streptokokus dan karenanya dapat digunakan sebagai salah satu kriteria dalam pemilihan vaksin kandidat.

Berdasarkan atas karakter permukaan, sifat perlekatan dan kemampuan invasi maka SGC 5.60 dan SGC 6.29 dalam penelitian ini berpeluang untuk dipelajari sebagai kandidat vaksin.



Gambar 3. Reaksi Presipitasi Antiserum Hemaglutinin dengan Preparasi Antigen Hemaglutinin SGC (a) dan SGB (b).

KESIMPULAN

Penyebab wabah babi dan kera yang terjadi di Bali dan beberapa wilayah di Indonesia pada awal tahun 1994 adalah streptokokus grup C yang kemudian diketahui sebagai *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Bakteri ini memiliki kapsul yang diketahui dengan melihat penampilan fenotip bakteri. Kapsul bertanggungjawab terhadap sifat perlekatan bakteri pada permukaan sel epitel inang dan mampu menghambat aktivitas fagositosis. Berdasarkan atas karakter permukaan bakteri dan sifat biologiknya maka SGC 5.60 dan SGC 6.29 berpeluang sebagai kandidat vaksin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dana penelitian yang mendasari penelitian ini adalah Proyek Pengkajian Pelaksanaan Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar Nomor : 08/PPIPD/DPPM/96/ PPIPD/1996 tanggal 22 Juli 1996, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia. Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Agus Somantri dan Sdr. M. Soleh atas bantuan teknis di laboratorium dan Sdr. Elan Jaenudin atas bantuan pengetikan untuk keperluan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Blobel, H. und T. Schliesser. 1980. Streptokokken. *In*. Blobel, H. und T. Schliesser. (*Eds*). Handbuch der bakterillen Infeksionen beiTieren, Band II.

Campo, R.E., D.R. Schultz and A.L. Bisno. 1995. M-protein of Group G Streptococci : Mechanisms of Resistance to Phagocytosis. *J.Infect. Dis*., 171: 601- 606.

Dartini, N.L., Soeharsono, E.P. Alit, N. Dibya, D.M.N.Dharma, dan K.E. Supartika. 1994. Karakterisasi *Streptococcus sp.* yang Diisolasi dari Letupan Penyakit pada Babi dan Kera di Propinsi Bali. Makalah dalam *Kongres XII dan Konferensi Ilmiah VI PDHI.* Surabaya, 21 - 24 November 1994.

Devriese. L. A. 1991. Streptococcal Ecovars Associated with Different Animal Species: Epidemiological Significance of Serogroups and Biotypes. *J. Apll. Bacteriol.*, 71: 478-483.

Dharma, D.M.N. 1994. Wabah Streptokokosis pada Babi dan Kera di Bali. *Inlavet, I*(2): 1-2.

Huminto. H., E. Harlina, F.H. Pasaribu dan I.W.T. Wibawan. 1997. Sub Populasi Fase Varian Streptokokus Grup C Penyebab Wabah Penyakit pada Babi dan Kera di Indonesia. Laporan Penelitian Dasar, FKH-IPB. DIKTI.

Oikawa, M., M. Kamada, I. Yoshikawa dan T. Yoshikawa. 1994. Pathology of Equine pneumonia associated with transport and isolation of *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*. *J. Comp. Pathol.*, 111: 205-212.

Rolle, M. und A. Mayr. 1984. Mikrobiologie, Infeksious und Seuchenlehre, S. Auflage. Enke Verlag.

Rudiyanto, M.D. dan D.M.N. Dharma. 1994. Letupan Streptokokosis di Bali Menularkah ke Manusia. *Infovet*, (15): 17-18.

Scanlan, C.M. 1988. Introduction to Veterinary Bacteriology. 1st ed. Iowa state Univ. Press/Ames. 456 pages.

Soeharsono dan N. Dibya. 1994. Gambaran Streptokokosis pada Babi. *Infovet*, (4): 18.

Wibawan, I.W.T. and C. Lämmler. 1990. Properties of Group B Streptococci with Protein Surface Antigen X and R. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2834-2836.

Wibawan, I.W.T. dan F.H. Pasaribu. 1994. Identifikasi dan Karakterisasi *Streptococcus sp.* Penyebab Wabah pada Babi dan Kera di Propinsi Bali. Laporan Kerja. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Wibawan, I.W.T. and C. Lämmler. 1992. Relationship Between Gruop B Streptococcal Serotype and Cell Surface Hydrophobicity. *J. Vet. Med.*, B39: 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 J. Smola. 1993. Properties and Type Antigen Pattern of Group B Streptococcal Isolates from Pig and Nutria. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 762-764.