ISOLAT Streptococcus agalactiae ASAL SAPI PENDERITA MASTITIS SUBKLINIS : I. Ekspresi fenotip isolat *in vitro*

Streptococcus agalactiae isolates FROM SUBCLINICAL MASTITIS CATTLE : I. *In vitro* phenotypic expression of isolates

Iwan H. Utama[1], Ninuk S. Rejeki[2], I Made Sukada[1], dan I Wayan T. Wibawan[2]

ABSTRAK

Sebanyak 36 isolat lapang *Streptococcus agalactiae* asal sapi penderita mastitis subklinis di daerah Bogor diamati ekspresi fenotipnya yang meliputi tipe hemolisis yang dihasilkan, kekeruhan pada supernatan media cair dan bentuk koloni pada media semi padat (*Soft agar*). Sebanyak sembilan, 15 dan 12 isolat memperlihatkan hemolisis tipe α, β, dan γ. Ekspresi fenotip pada supernatan medium cair memperlihatkan 14 isolat dengan supernatan media keruh, 18 isolat dengan supernatan media sedikit keruh dan sisanya dengan supernatan media jernih. Sedangkan pada media semi padat memperlihatkan 15 isolat dengan bentuk koloni kebanyakan difus tebal, difus tipis dan kompak, 17 isolat dengan koloni kebanyakan difus tipis, difus tebal dan kompak, sisanya dengan koloni kompak tanpa adanya koloni difus. Terlihat adanya hubungan antara pola pertumbuhan pada media cair dan bentuk koloni pada media semi padat, keragaman koloni pada agar semi padat menunjukkan adanya **variasi fase**.

ABSTRACT

Thirty six isolates *Streptococcus agalactiae* from subclinical mastitis cattle in Bogor were examined their phenotypic expressions such as hemolytic pattern, supernatant turbidity in liquid medium, and colony morphology in semisolid medium (agar semi solid). Nine, fifteen and twelve isolates showed their α, β, and γ hemolytic patterns respectively. Fourteen isolates showed turbid supernatant, 18 isolates with less turbid supernatant, and the rest gave clear supernatant in fluid medium. In agar semi solid, 15 isolates showed mostly thick diffuse colonies in combination with thin diffuse and compact colonies, 17 isolates with mostly thin diffuse colonies in combination with thick diffuse and compact colonies. The rest isolates showed compact without diffuse colonies. There was a relation between growth pattern in fluid medium and colony morphology in agar semi solid, and the variability of colony morphologies in agar semi solid indicated the incidence of **phase variation**.

---

[1] Program Studi Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar-Bali
[2] Laboratorium Patologi Veteriner, Bagian Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16151

PENDAHULUAN

Streptococcus agalactiae (grup B menurut Lancefield - SGB) merupakan salah satu penyebab mastitis (Hutabarat *et al.*, 1984), yang kemampuannya melekat dan berkolonisasi pada epitel *ductus mamae* merupakan salah satu faktor yang bertanggung jawab dalam sifat patogenesis bakteri tersebut (Bramley dan Hogben, 1982).

Penelitian menunjukkan bahwa isolat *S. agalactiae* yang tidak memiliki kapsel memperlihatkan kemampuan melekat dan berkolonisasi pada epitel termasuk epitel ambing (Wibawan *et al.*, 1992). Diperkirakan komponen permukaan sel seperti asam teikoat / lipoteikoat dan protein-protein hidrofobik bertanggung jawab dalam proses tersebut (Teti *et al.*, 1987), selain itu komponen tersebut berpengaruh terhadap ekspresi fenotip bakteri yang bersangkutan (Opdebeeck *et al.*, 1988).

Secara *in vitro*, ekspresi fenotip dapat ditunjukan dengan menumbuhkan bakteri pada media semipadat (Kane *et al.*, 1975) atau pada media cair (Wibawan dan Laemmler, 1990). Pada media semi padat dapat ditunjukan jenis koloni yang tumbuh, yaitu diffus atau kompak (Kane *et al.*, 1975).

Penelitian ini bertujuan mengamati ekspresi fenotip (kekeruhan dan bentuk koloni) isolat lapang *S. agalactiae* dari sapi penderita mastitis subklinis, sehingga dari hasil yang teramati dapat dipakai sebagai informasi dasar untuk kajian patogenesis mastitis.

BAHAN DAN METODE

Isolat *S. agalactiae*

Sebanyak 36 isolat *S. agalactiae* digunakan dalam penelitian ini. Sebelumnya isolat bakteri telah diisolasi dalam bentuk biakan murni dan koloni tunggal (Yanuarsi, 1994; Sukada, 1996) dan dikonfirmasi kembali secara biokimia dan serologi.

Pengamatan ekspresi fenotip

Satu koloni isolat ditumbuhkan pada tabung reaksi yang berisi media cair Todd Hewitt (Difco, USA) dan media semipadat Todd Hewitt yang mengandung 0,15% agar (Serva, Germany) pada suhu 37 °C selama 18 jam (Wibawan dan Laemmler, 1990). Pengamatan ekspresi fenotip pada media cair di supernatan medium dengan tiga kategori, yaitu keruh, sedikit keruh, dan jernih (dengan sesedikit mungkin goncangan), sedangkan pada media semi padat diamati bentuk koloni yang ada, dan ini dikategorikan jadi tiga bentuk koloni, yaitu difus tebal, tipis dan koloni kompak (Kane *et al.*, 1975; Wibawan dan Laemmler, 1990). Diamati pula hubungan antara sebaran bentuk koloni difus dan jenis kekeruhan supernatan (Ilstrup, 1990).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor dari bulan Juli hingga Oktober 1995.

HASIL DAN PEMBAHASAN

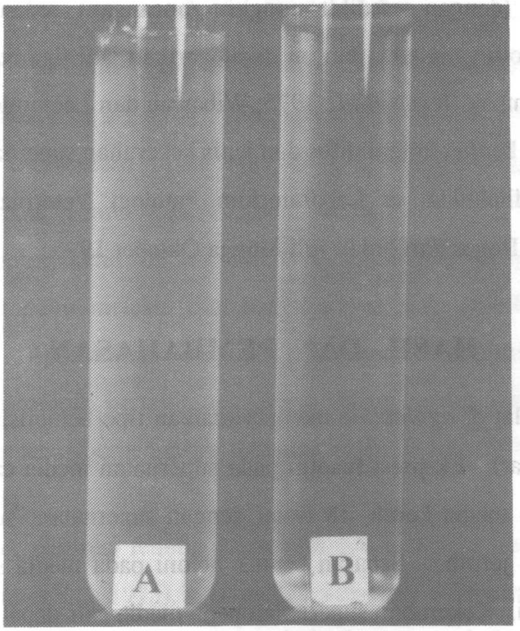
Sebanyak 36 isolat *S. agalactiae* memperlihatkan tipe hemolisis α (sembilan isolat), β (15 isolat) dan γ (12 isolat). Ekspresi fenotip pada supernatan media cair memperlihatkan 14 isolat dengan supernatan media keruh, 18 isolat dengan supernatan sedikit keruh dan empat isolat dengan supernatan jernih. Sebaran bentuk koloni pada media semi padat ditampilkan pada Tabel 1 di bawah ini. Kekeruhan supernatan pada media cair dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan bentuk koloni pada media semi padat terlihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Sebaran Bentuk Koloni *S. agalactiae* Isolat Lapang pada Media Semi Padat

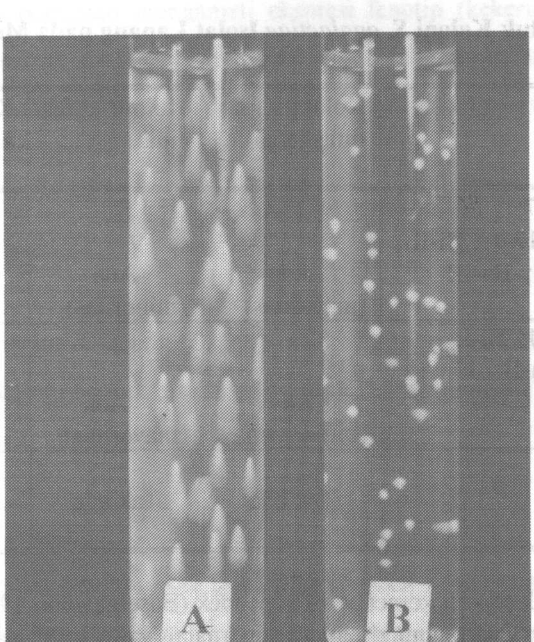
Kode isolat	Koloni difus tebal	Koloni difus tipis	Koloni kompak	Jumlah isolat
117; Bi-III; 63; 114; 27; Di-III; cp-20; Da-II; **12-1**; Bi-III; **34F**; **cp-19**; **Bi-II**; **116**; Ba-III	Ada (mayoritas)	Ada (minoritas)	Ada	15
cp-14; Di-I; 73; 94; 64; Bi-I; 84; Ba-I; 76; Da-I; Ba-II; 30; 17; **Vc**; **Di-II**; **Da-III**; **78**	Ada (minoritas)	Ada (mayoritas)	Ada	17
34S; 57; 1; 49	Tak ada	Tak ada	Ada	4

Keterangan:

1. Koloni difus berbentuk seperti komet berekor pendek (Baselga *et al.*,1994).
2. Isolat pada baris pertama memperlihatkan supernatan yang keruh pada media cair (kecuali yang dicetak tebal memperlihatkan sifat sedikit keruh).
3. Isolat pada baris kedua memperlihatkan supernatan sedikit keruh pada media cair (kecuali yang di cetak tebal memperlihatkan supernatan keruh).



Gambar 1.Perbandingan antara Supernatan Medium Cair yang Keruh (A) dan Jernih (B).



Gambar 2. Bentuk Koloni pada Agar Semi Padat, Koloni Difus Tebal (A) dan Kompak (B).

Sebaran bentuk koloni (difus tipis dan tebal) dan kekeruhan supernatan pada media cair yang dihasilkannya tertera pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Sebaran Bentuk Koloni *S. agalactiae* pada Media Semi Padat dan Kekeruhan Supernatan Pada Media Cair Yang Ditimbulkannya

Ekspresi fenotip pada supernatan media cair	Koloni difus		Jumlah
	Difus tebal	Difus tipis	
Keruh	10	4	14
Sedikit keruh	5	13	18
Jumlah	15	17	32

Keterangan : $P > 0{,}05$

Dari data di atas terlihat, umumnya isolat lapang *S. agalactiae* memiliki tipe hemolisis β dan γ (75% isolat) dan hanya 25%-nya memiliki tipe α, meskipun tipe β ada tapi pola hemolisisnya relatif sempit. Hal ini pernah dilaporkan oleh Wilson dan Salt (1978). Pengamatan ekspresi fenotip pada media cair dan semi padat secara tidak langsung dapat diamati keberadaan kapsel (Wibawan, 1993), sedangkan isolat berkapsel memiliki koloni difus berbentuk difus seperti komet (Kane *et al.*, 1975; Beselga *et al.*, 1994). Fenomena ini terjadi sebagai akibat pembentukan glikokaliks pada permukaan sel bakteri yang tergantung tebalnya glikokaliks yang terbentuk, bisa tebal atau tipis yang juga mencerminkan bentuk koloni difus (tebal atau tipis) (Opdeebeck *et al.*, 1985; Opdeebeck *et al.*, 1988).

Dari Tabel 1 juga dilihat sebaran bentuk koloni pada media semi padat (difus tebal, difus tipis dan kompak), beberapa isolat seperti Vc; Di-II; Di-III; dan 78 meskipun memiliki mayoritas koloni pada media semi padat difus tipis menyebabkan supernatan media cair yang ditumbuhinya menjadi keruh. Demikian juga untuk isolat 34F; cp-19; Bi-II, 12-1, dan 116 dengan mayoritas koloni difus tebal menyebabkan supernatan media cair yang ditumbuhinya sedikit keruh. Belum jelas penyebab hal ini, tapi Wibawan (1993) mengatakan hal ini disebabkan oleh panjang rantai yang terbentuk di media cair. Isolat dengan rantai panjang cenderung mengendap ke dasar tabung seperti yang telah diamati pada koloni yang kompak. Inilah yang menjadi penyebab untuk isolat 34F; 116; cp-19; Bi-II; dan 12-1 dengan kemungkinan mayoritas terbentuk rantai panjang jika ditumbuhkan di media cair.

Demikian juga untuk isolat Vc; Di-I, Da-III, dan 78 dengan mayoritas rantai pendek yang terbentuk di media cair.

Jika dihubungkan dengan Tabel 2, jelas keberadaan koloni difus menyebabkan supernatan media cair yang ditumbuhi bakteri menjadi keruh atau sedikit keruh. Dari sini dapat dilihat isolat dengan mayoritas koloni difus tebal memberikan supernatan media cair yang keruh, sedangkan mayoritas koloni difus tipis memberi supernatan yang sedikit keruh. Secara statistik penyimpangan fenomena ini tidak nyata ($P>0,05$).

Fenomena lain yang teramati pada media semi padat ialah adanya **variasi fase** dari isolat tersebut. Hal ini menunjukkan bakteri tersebut mampu mengekspresikan dirinya dalam bentuk berkapsel atau tidak. Dalam bentuk berkapsel, ia menunjukkan sifat invasif dan mampu menimbulkan sepsis, sedangkan dalam keadaan tidak berkapsel, ia mampu melekat dan berkolonisasi pada sel epitel ambing (Salasia et al., 1994, Tobing, 1996). Hal ini menunjukkan satu kemungkinan dalam mekanisme patogenesis mastitis yang tentunya masih memerlukan kajian lebih lanjut (Kirk et al., 1994).

KESIMPULAN

Sebagian besar isolat *S. agalactiae* tipe hemolitik yang berasal dari sapi penderita mastitis subklinis adalah β dan γ (75%) dan nampak adanya variasi fase (88,9%) dari seluruh isolat yang ada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Drh. Hernomoadi Huminto, MVSc, Kepala Laboratorium Patologi Veteriner FKH-IPB yang menyediakan fasilitas penelitian, Sdr. Agus Somantri dan Sdr. Soleh, yang telah banyak membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Baselga, R., I. Albizu, and B. Amorena. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. *A review. Vet. Microbiol.* 39: 195-204.

Bramley, A.J., and E.M. Hogben. 1982. The adhesion of human and bovine isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B) to bovine mamary gland and epithelial cells. *J. Comp. Path.* 92: 131-137.

Hutabarat, T.P.N., S. Witono, dan D.H.A. Unruh. 1984. Pengaruh faktor lingkungan dan sanitasi pemerahan terhadap mastitis. Laporan Tahunan Hasil Penyidikan Penyakit Hewan di Indonesia periode tahun 1983-1984. *Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah IV.* Jogjakarta.

Ilstrup, D.M. 1990. Statistical methods in microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 219 226.

Kane, J.A., A.E. Rabkin, and W.W. Karakawa. 1975. Demonstration of the capsular antigens of bovine group B streptococci by serum agar semi padat method. *J. Clin. Microbiol.* 2 : 35-41.

Kirk, J.H., F. DeGraves, and J. Tyler. 1994. Recent progress in treatment and control of masti-tis in cattle. *JAVMA.* 204 : 1152- 1158.

Opdebeeck, J.P., D.O. Boyle, and A.J. Frost. 1985. The expression of capsule in serum agar semi padat by *Staphylococcus aureus* isolated from human and clinical sources. *J. Med. Microbiol.* 19: 275- 278.

Opdebeeck, J.P., D.L. Watson, and A.J. Frost. 1988. Colony morphology of *Staphylococcus aureus* in serum agar semi padat following in vivo and *in vitro* growth. *Vet. Microbiol.* 16 : 87-91.

Salasia, S.I.O., I W.T. Wibawan, Ch. Laemmler, and M. Sellin. 1994. Phase variation in streptococci of serological group B characteristic properties of isolates from human and bovine infection. APMIS 102 : 925-930.

Sukada, I M. 1996. Kejadian mastitis subklinik oleh *Streptococcus agalactiae* di daerah Semplak Bogor dan pengaruhnya terhadap kualitas susu. Thesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Teti, G., F. Tomasello, M.S. Chiafallo, G. Orefici, and P. Mastroeni. 1987. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* 55 : 3057-3064.

Tobing, S.H.L. 1996. Peran fase varian *Streptococcus* grup B dalam mekanisme infeksi. Thesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Wilson, C.D., and G.F.H. Salt. 1978. Streptococci in animal desease. In Skinner, F.A., and L.B. Quesnel (Eds). Streptococci. *The society for applied bacteriology symposium* series no. 7. Academic Press, London, U.K. 143-156.

Wibawan, I W.T., and Ch. Laemmler. 1990. Properties of group B streptococci with protein surface antigen X and R. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2834-2836.

Wibawan, I W.T., Ch. Laemmler, 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. 1993. Type antigene von streptokokken der serologische gruppe B und deren Bedeutung als virulenzfaktoren. Inaugural-dissertation Justus-`Liebig Universitaet, Gießen, Germany.

Yanuarsi, Y. 1994. Penentuan serotipe *Streptococcus agalactiae* dari isolat lapang. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.