AKTIVITAS HEMAGLUTINASI *Streptococcus equi* SUBSP. *zooepidemicus* PADA DARAH BABI

HAEMAGGLUTINATION ACTIVITIES OF *Streptococcus equi* SUBSP. *zooepidemicus* IN PIG'S BLOOD

Iwan Harjono Utama[1], I Ketut Berata[1], I Gusti Ketut Suarjana[1], I Nengah Kerta Besung[1], Agnes Endang Tri Hastuti Wahyuni[2], Sri Estuningsih[3] dan Fachriyan Hasmi Pasaribu[3]

[1]Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman Denpasar 80232, Bali, Telp. (0361) 223791, 701808 Faks. (0361) 262901 E-mail: fkhunud@denpasar.wasantara.net.id
[2]Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, Sekip Unit II Bulaksumur YOGYAKARTA 55281
[3]Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151

ABSTRAK

Media Veteriner. 1999. 6(1): 11-14

Sebanyak 16 isolat streptokokus grup C asal wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali diamati aktivitas hemaglutinasinya menggunakan suspensi 2% eritrosit babi. Sebanyak lima isolat (31,25%) memperlihatkan aktivitas sangat kuat (++) dengan rataan geometrik sebesar $2^{2,8}$, lima isolat (31,25%) memperlihatkan aktivitas kuat (+) dengan rataan geometrik sebesar 2^2, dan sisanya enam isolat (37,5%) memperlihatkan aktivitas hemaglutinasi lemah atau negatif. Bakteri yang tidak berkapsul memperlihatkan aktivitas hemaglutinasi lebih kuat dibandingkan bakteri berkapsul. Perlakuan dengan pemanasan pada suhu 90 °C, ekstraksi dengan HCl 0,1 N dan opsonisasi menurunkan titer hemaglutinasi.

Kata-kata Kunci: *Streptococcus equi*, SGC, aktivitas hemaglutinasi

ABSTRACT

Media Veteriner. 1999. 6(1): 11-14

Sixteen isolates of group C streptococci taken during outbreak in pigs and monkeys in Bali were examined for their haemaglutination activities using 2% erythrocyte suspension from pigs. Five isolates (31,25%) showed very strong (++) result with geometric titer mean of $2^{2,8}$, other isolates (31,25%) gave strong (+) results with geometric titer mean of 2^2 and the remain six isolates (37,5%) showed weak or negative haemagglutination activities. Nonencapsulated bacteria yielded haemagglutination activities stronger than encapsulated. Treatments with heating up to 90 °C, HCl extraction and opsonization reduced haemagglutination titers.

Key Words: *Streptococcus equi*, SGC, haemagglutination activity

PENDAHULUAN

Kontak bakteri-inang merupakan kajian ilmiah menarik karena menjadi titik awal keberhasilan suatu infeksi. Salah satu metode sederhana untuk mempelajari kontak tersebut ialah interaksi bakteri dengan eritrosit inangnya melalui fenomena hemaglutinasi eritrosit yakni eritrosit beraspek seperti titik-titik yang dapat diamati secara visual sebagai akibat interaksi antara eritrosit dan suatu partikel tertentu. (Arp, 1988). Pada *Escherichia coli* peran fimbriae telah diketahui memiliki aktivitas tersebut (Duguid *et al.*, 1955).

Streptokokus grup D dan B diketahui memiliki protein permukaan, dikenal dengan hemaglutinin, yang bertanggung jawab terhadap aktivitas hemaglutinasi (Göttschalk *et al.*, 1990; Wibawan *et al.*, 1993). Demikian juga dengan *Shigella* (Qadri *et al.*, 1991); *Bacteroides fragilis* (Namavar *et al.*, 1994) dan *Helicobacter pylori* (Taylor *et al.*, 1992). Hemaglutinin merupakan salah satu faktor virulen yang dimiliki bakteri patogen dan bertanggung jawab dalam patogenesis infeksi (Kurl *et al.*, 1989).

Streptococcus zooepidemicus, sekarang dikenal dengan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* dan yang termasuk grup C menurut Lancefield, merupakan bakteri yang hidup di kuda sebagai inang utamanya (Moore dan Byrans, 1969) dan hewan lain (Norcross, 1969). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* yang diisolasi dari wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali pada tahun 1994 merupakan salah satu patogen yang relatif baru di Indonesia (Dartini *et al.*, 1994; Dharma, 1994).

Penelitian ini bertujuan mengamati keberadaan hemaglutinin pada permukaan sel *S. equi* subsp. *zooepidemicus* yang diisolasi dari wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali.

BAHAN DAN METODE

Sebanyak 16 isolat streptokokus yang terdiri dari 14 isolat asal wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali, satu isolat (Mas-B) asal wabah streptokokosis pada babi di Propinsi Lampung (diperoleh dari Balai Penyidikan Penyakit Hewan-BPPH Wilayah III Bandarlampung) dan satu isolat (Maros-1) asal wabah streptokokosis pada babi di Propinsi Sulawesi Selatan (diperoleh dari BPPH Wilayah VII Maros). Dari 14 isolat asal wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali, enam isolat (5.60, 6.29, 6.4a, 6.4b) berasal dari babi, dua isolat dari kera (6.73 dan 6.34) diperoleh dari BPPH Wilayah VI Denpasar-Bali, dua isolat asal babi (Bal-1 dan Bal-2) diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner – Bogor dan enam isolat lainnya (11, 14, 17, 18, 21 dan 22) berasal dari spesimen klinik yang berupa darah dari babi penderita yang belum diobati. Semua isolat telah diuji dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* yang termasuk grup C (Dartini *et al.*, 1994; Wibawan dan Pasaribu, 1994; Utama, 1996).

Bakteri ditumbuhkan pada media cair Todd Hewitt (Diffco) selama 18 jam kemudian diamati ekspresi fenotip yang dinyatakan sebagai keruh (K) dan jernih (J) pada supernatan di media tersebut (Wibawan dan Laemmler, 1990). Setelah pengamatan, suspensi sel dicuci menggunakan larutan garam penyangga fosfat (*phsophate buffered saline*-PBS) 0,01 M dan dikalibrasi hingga mengandung 10^9 sel per ml dengan cara menurut Utama *et al.* (1997). Suspensi ini siap untuk pengujian aktivitas hemaglutinasi.

Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan menggunakan suspensi eritrosit babi 2% dengan cara menurut Gottschalk *et al.* (1990) dan Wibawan *et al.* (1993). Sebanyak 25 µl suspensi bakteri dicampur dengan 25 µl suspensi eritrosit 2% di atas gelas obyek. Setelah pencampuran, gelas obyek digoyang-goyang dan dibiarkan selama dua menit pada suhu ruang. Hasilnya dinyatakan sebagai (+) untuk aktivitas yang kuat dan (++) untuk yang sangat kuat. Sebagai kontrol positif digunakan patokan aktivitas hemaglutinasi isolat *Streptococcus agalactiae* galur 24/60 (protein X^+) pada suspensi darah sapi 2% (Rejeki, 1996). Isolat dengan positif hemaglutinin (aktivitas hemaglutinasi ++) diukur titer hemaglutinasinya dengan melakukan pengenceran serial kelipatan 2 pada suspensi bakteri uji. Untuk melihat pengaruh perlakuan fisikokimia, dilakukan pemanasan suspensi bakteri pada suhu 90 ^{0}C selama 15 menit dan dilakukan ekstraksi antigen menggunakan larutan HCl 0,1 N dengan cara pelet sel bakteri (100-200 mg) dicampur dengan 1 ml larutan HCl 0,1 N dan kemudian ditangas pada suhu 52 ^{0}C selama 60 menit (Wilkinson dan Eagon 1971). Setelah penangasan, suspensi sel yang mengandung HCl 0,1 N dicuci menggunakan larutan PBS 0,01 M dan dilakukan kalibrasi hingga mengandung 10^9 sel per ml.

Opsonisasi menggunakan serum babi, yang sehat secara klinis dan diambil dari Rumah Potong Hewan Kotamadya Daerah Tingkat II Bogor, dengan cara mencampur pelet sel bakteri (100-200 mg) dengan 0,2 ml serum kemudian diinkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi, campuran dicuci menggunakan larutan PBS 0,01 M dan dikalibrasi seperti di atas. Setelah semua perlakuan, dengan cara yang sama semua suspensi bakteri diuji dan diamati kembali aktivitas hemaglutinasinya. Untuk penentuan titer hemaglutinasi dan mengamati pengaruh perlakuan dilakukan uji hemaglutinasi menggunakan plate-mikro (Sigma, USA). Pengamatan dilakukan dengan ulangan sebanyak tiga kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat pertumbuhan *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pada media cair dan aktivitas hemaglutinasinya tertera pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa bakteri dengan ekspresi fenotip jernih cenderung memiliki aktivitas hemaglutinasi yang menandakan bahwa bakteri memiliki protein permukaan dan asam lipoteikoat dinding seperti yang teramati pada *S. agalactiae* (grup B) (Teti *et al.*, 1987), *S. suis* (Gottschalk *et al.*, 1990) dan *S. pyogenes* (Courtney *et al.*, 1990).

Tabel 1. Ekspresi fenotip *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pada media cair aktivitas hemaglutinasinya

Kode isolat	Ekspresi fenotip	Aktivitas Hemaglutinasi
5.60	Keruh	+
6.29	Jernih	++
11	Keruh	+
Bal-1	Keruh	±
Bal-2	Jernih	++
22	Keruh	+
Mas-B	Jernih	-
6.73 (kera)	Jernih	++
18	Jernih	++
17	Keruh	-
6.4a	Keruh	+
6.4b	Keruh	++
21	Keruh	±
6.34 (kera)	Jernih	+
14	Keruh	-
Maros-1	Jernih	±

Interaksi antara hemaglutinin dan reseptornya tidak hanya diperani oleh struktur protein saja Namavar *et al* (1994), tetapi juga asam sialat pada *S. agalactiae* (Wibawan *et al.*, 1993) dan asam hyaluronat pada *S. equi* subsp. *zooepidemicus* dan pada *Pasteurella multocida* (Esslinger *et al.*, 1992).

Titer hemaglutinin *S. equi* subsp. *zooepidemicus* tertera pada Tabel 2 dan terlihat bahwa bakteri dengan aktivitas hemaglutinasi yang sangat kuat memiliki rataan geometrik titer sebesar $2^{2,8}$ dan isolat dengan aktivitas hemaglutinasi kuat hanya sebesar 2^2. Pengaruh beberapa perlakuan terhadap isolat dengan aktivitas hemaglutinasi sangat kuat tertera pada Tabel 3 dan terlihat bahwa terjadi penurunan titer hemaglutinin pada bakteri yang menerima perlakuan fisik dan kimia.

Panas diduga menyebabkan struktur hemaglutinin mengalami sedikit perubahan yang bisa terjadi di tingkat struktur kwartener atau tersier protein yang umumnya mengenai ikatan inter- dan intramolekuler protein (Lehninger, 1990) sehingga aktivitas hemaglutinasi menghilang dan menyebabkan interaksi molekuler antara hemaglutinin dan reseptor

Tabel 2. Titer hemaglutinin streptokokus grup C pada suspensi eritrosit babi 2%

Kode isolat	Pengenceran suspensi isolat				
	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4
Aktivitas sangat kuat					
6.4b	++	++	++	±	-
6.29	++	++	+	±	-
Bal -2	++	++	++	++	+
6.73 (asal kera)	++	++	++	+	-
18	++	++	++	+	±
Aktivitas kuat					
5.60	+	+	+	±	-
6.4a	+	+	+	-	-
11	+	+	±	-	-
22	+	+	+	-	-
6.34 (asal kera)	+	+	+	+	-

Keterangan : Isolat tanpa tanda kurung berasal dari babi penderita streptokokosis

Tabel 3. Pengaruh perlakuan panas, ekstraksi HCl dan opsonisasi dengan serum babi sehat terhadap aktivitas hemaglutinasi SGC

Kode isolat	Perlakuan	Pengenceran suspensi isolat		
		2^0	2^1	2^2
6.4b	Panas	++	++	-
	HCl	++	+	-
	Opsonisasi	++	++	+
6.73	Panas	++	+	±
	HCl	++	+	-
	Opsonisasi	++	+	-
Bal II	Panas	++	++	±
	HCl	++	+	-
	Opsonisasi	++	+	-
6.29	Panas	++	+	-
	HCl	++	+	±
	Opsonisasi	++	++	+
18	Panas	++	++	+
	HCl	++	+	-
	Opsonisasi	++	++	±

kurang stabil (Stryer, 1988). Dugaan lain yang muncul adalah hemaglutinin bukan merupakan protein, tapi asam lipoteikoat dinding sel. Menurut Courtney *et al* (1990) dan Gottschalk *et al* (1990) asam lipoteikoat dan teikoat juga mampu memperantarai perlekatan bakteri pada sel inang. Perlakuan ekstraksi antigen dengan HCl 0,1 N menyebabkan imunodeterminan antigen yang umumnya terdapat di permukaan sel terlepas (Wilkinson dan Eagon, 1971). Dari data pada Tabel 3 menyiratkan bahwa pelepasan ini terjadi pada sebagian imunodeterminan atau pada sisi lain dari struktur protein antigen yang tidak mempengaruhi fungsionalnya. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas hemaglutinasi yang masih nampak meskipun antigen bakteri telah diekstraksi.

Opsonisasi dengan serum babi yang secara klinis sehat juga hanya sedikit menurunkan aktivitas hemaglutinasi. Nampaknya serum babi tersebut tidak memiliki antibodi spesifik terhadap hemaglutinin *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Utama, 1996). Sedikit penurunan aktivitas hemaglutinasi akibat opsonisasi dapat disebabkan oleh berbagai komponen serum seperti antibodi dan komplemen yang merupakan komponen utama utuk opsonisasi (Tizard, 1982). Komponen serum lain seperti vitronektin, albumin dan fibronektin juga ada kemungkinan dapat berikatan secara non spesifik dengan komponen permukaan sel *S. equi* subsp. *zooepidemicus* seperti yang telah diamati pada *S. agalactiae* (Chatwal *et al.*, 1987; Kronvall et al., 1979). Hal ini merupakan salah satu penyebab menurunnya aktrivitas hemaglutinasi akibat opsonisasi dengan serum babi.

KESIMPULAN

Sepuluh dari 16 isolat *S. equi* subsp. *zooepidemicus* yang diuji memiliki aktivitas hemaglutinasi pada darah babi dengan titer $2^{2,8}$ (sangat kuat, ++) dan 2^2 (kuat, +). Titer hemaglutinin dipengaruhi oleh perlakuan panas, ekstraksi dengan HCl dan opsonisasi dengan serum yang berasal dari babi sehat secara klinis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan ke Pimpinan Proyek Hibah Bersaing VI/1/1997-1998 Ditjen Dikti Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah mendanai penelitian ini, Kepala Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor atas izin yang diberikan dan Sdr. Agus Sumantri dan Sdr. Rudiyatna atas bantuan teknisnya.

DAFTAR PUSTAKA

Arp, L. H. 1988. Bacterial infection of mucosal surfaces. *In*: Roth, J. A. (*Ed.*). Virulence Mechanism of Bacterial Pathogens. Am. Soc. Microbiol. Washington D. C. pp:3-27.

Courtney, H. S., D. L. Hasty, and I. Ofek. 1990. Hydrophobicity of group A streptococci and it's relationship to adhesion of streptococci to host cells. *In*: Doyle, R. J., and Mel Rosenberg (Eds). Microbial Cell Surface Hydrophobicity. Am. Soc. Microbiol. Washington D. C. pp: 361-386.

Dartini, N. L., S. Soeharsono, I. G. M. A. Ekaputra, N. Dibia, D. M. N. Dharma dan K. E. Supartika. 1994. Karakterisasi streptokokus yang diisolasi dari letupan penyakit pada babi dan kera di Propinsi Bali. *Makalah Kongres XII dan Konferensi Ilmiah VI Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia*. Surabaya, 20–23 November 1994.

Dharma, D. M. N. 1994. Wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali. *Informasi Laboratorium Veteriner* I/2: 1-2. Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah VI-Bali

Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster and P. N. Edmunds. 1955. Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 70: 335-348.

Esslinger, J., R. S. Seleim dan H. Blobel. 1992. Hyaluronic acid mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells. *In*: B. E. Patten, T. L. Spencer, R. B. Johnson, D. Hoffman and L. Lehane. (*Eds.*) Pasteurellosis in Production Animals. *Proceeding of an International Workshop. ACIAR Proceedings*, 43: 40-43.

Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques and R. Higgins. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2156-2158.

Kurl, D. N., S. Haataja and J. Finne. 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: Demonstration of novel sugar specific cell binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.*, 57: 384-389.

Lehninger, A. L. 1990. Prinsip-prinsip Biokimia jilid 1. Terjemahan oleh Maggy Thenawijaya. Penerbit Gramedia, Jakarta. 369 hal.

Moore, B. O. and J. T. Byrans. 1969. Antigenic classification of group C animal streptococci. *JAVMA*, 155: 416-421.

Namavar, F., M. W. Van der Bijl, B. J. Appelmelk,J. De Graaf and D. M. Madaren. 1994. The role of neuramidase in hemagglutination and adherence to colon Wi Dr cells by *Bacteroides fragilis*. *J. Med. Microbiol.*, 40: 393-396.

Norcross, N. C. 1969. Comments of antigenicity of the group C streptococci. *JAVMA*, 155: 414-415.

Qadri, F., S. Haq, S. A. Hassain, I Ciznar and S. Tzipari. 1991. The association of hemagglutination and adhesion with lipopolysaccharide of *Shigella dysentriae* serotype 1. *J. Med. Microbiol.*, 34: 259-264.

Rejeki, N. S. 1996. Aktivitas Hemaglutinasi *Streptococcus agalactiae* yang Diisolasi dari Sapi Mastitis Subklinik. *SKRIPSI* Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Stryer, L. 1988. Biochemistry. W. H. Freeman and Co. San Francisco, USA. 1089 pp.

Taylor, N. S., A. T. Hasubski, J. G. Fox and A. Lee. 1992. Hemagglutination profiles of *Helicobacter* species that cause gastritis in man and animals. *J. Med. Microbiol.*, 37: 299-303.

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.

Tizard, Ian. 1982. An Introducton to Veterinary Immunology. 2nd. Ed. W. B. Saunders and Co. Philadelphia, USA. 363 pp.

Utama, I. H. 1996. Survey serologis serum babi yang didapat dari Rumah Potong Hewan Kotamadya Bgor terhadap streptokokus grup C. Data tidak dipublikasi.

_________., N. S. Rejeki, I M. Sukada dan I W. T. Wibawan. 1997. Isolat *Streptococcus agalactiae* asal sapi penderita mastitis subklinik I : Ekspresi fenotip isolat in vitro. *Media Veteriner*, 4(1): 17-18.

Wilkinson, H. W., and R. G. Eagon. 1971. Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect. Immun.*, 4: 596-604.

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.

_______________., Ch. Laemmler, R. S. Seleim and F. H. Pasaribu. 1993. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 2173-2178.

Wibawan, I W. T. dan F. H. Pasaribu. 1994. Laporan kerja identifikasi dan karakterisasi *Streptococcus* sp. penyebab wabah pada babi dan kera di Propinsi Bali. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. 5 hal.