

Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

Vol. 8, No. 3, September 2007

Terakreditasi Dirjen Dikti S.K. No. 55/DIKTI/Kep/2005

VIRUS FLU BURUNG JAWA

MELACAK ANTIBODI
SALMONELLA ENTERITIDIS DAN *S. PULLORUM*

DEKSAMETASON
MENINGKATKAN KADAR INSULIN

MORFOMETRI & HISTOMORFOMETRI
TESTIS RUSA TIMOR

ASAM HYALURONAT
FAKTOR PEREKAT *S. EQUI*

INFEKSI CACING PITA
PADA AYAM PETELOR

PROTEIN KAPSID VIRUS JEMBRANA
MERANGSANG KEKEBALAN



Deteksi Asam Hialuronat Kapsul *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Sebagai Faktor Perlekatan pada Epitel Mukosa *Buccalis* Babi

(DETECTION OF CAPSULAR HYALURONIC ACID FROM *STREPTOCOCCUS EQUI* SUBSP. *ZOOEPIDEMICUS* AS AN ADHESIVE FACTOR ON BUCCAL EPITHELIAL CELLS OF SWINE)

**Iwan Harjono Utama¹, Aisjah Girindra², Fachriyan Hasmi Pasaribu³,
I Wayan Teguh Wibawan³, Aida Louise Tendén Rompis⁴ dan Endhie D. Setiawan**

¹Laboratorium Biokimia; ⁴Lab Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali, Fax. 0361 701 808 E-mail : iwanhu2001@yahoo.com,

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor,

³Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor,

⁵Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRAK

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* yang diisolasi dari babi dan kera di Bali memiliki kapsul yang tersusun atas asam hialuronat. Asam hialuronat pada kapsul ini mampu melekatkan bakteri pada sel epitel buccalis babi dan aktivitas perlekatan ini tidak dapat dihambat oleh larutan glukosa, N-asetil glukosamin, asam glukuronat dan campuran N-asetil glukosamin dan asam glukuronat yang masing-masing berkonsentrasi 2% dalam larutan bufer setimbang fosfat (PBS). Sel epitel yang diinkubasi dengan larutan asam hialuronat 5 mg (0,5%) dan 10 mg (1%) per ml PBS dapat menghambat aktivitas perlekatan bakteri. Demikian juga perlakuan inkubasi sel bakteri berkapsul yang dicampur dengan hialuronidase 1000 dan 2000 unit internasional dapat menurunkan kemampuan perlekatannya. Dapat disimpulkan bahwa asam hialuronat yang terdapat pada kapsul bakteri *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* mampu melekatkan bakteri tersebut pada sel epitel mukosa buccalis babi.

Kata-kata kunci : asam hialuronat, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, adhesi sel

ABSTRACT

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* isolated from swine and monkeys is known to possess hyaluronic acid capsules. The present study indicated the ability of the capsular hyaluronic acids to mediate bacterial adhesion to host epithelial cells; and that adhesion was not inhibited by glucose solution, N-acetylglucosamine, nor by mixed solution of N-acetylglucosamine and glucuronic acid in phosphate buffered saline solution. Whereas when epithelial cells were soaked in 5 mg and 10 mg hyaluronic acid bacterial adhesion was inhibited. Furthermore, treatment of encapsulated bacterial cells with hyaluronidase at 1000 and 2000 IU, significantly reduced the bacterial adhesion onto the buccal epithelial cells. It is clear that the bacterial capsule of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* were able to initiate the attachment of the organism onto the surface of host epithelial cells.

Key words: hyaluronic acid, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, cell adhesion

PENDAHULUAN

Proses perlekatan bakteri pada sel inang merupakan tahap awal proses infeksi (Mims, 1982). Berbagai komponen permukaan bakteri seperti asam teikoat (Nealson and Mattingly, 1985; Teti *et al.*, 1987), protein X pada *Streptococcus agalactiae*

grup B menurut Lancefield (Rainard, *et al.*, 1991; Wibawan *et al.*, 1992), protein M pada *Streptococcus pyogenes* grup A menurut Lancefield (Fischetti, 1989), vitronectin (Valentin Wiegand *et al.*, 1988a), mampu memperantarai perlekatannya pada sel inang. Namun, komponen permukaan sel bakteri bukan satu-satunya yang

bertanggung jawab atas proses perlekatan tersebut. Komponen cairan ekstraseluler inang, seperti fibronektin (Valentin Wiegand *et al.*, 1988b) juga berperan dalam perlekatan tersebut.

Streptococcus equi subsp. *zoepidemicus* (Farrow and Collins, 1984: dahulu *Streptococcus zoepidemicus*) adalah penyebab wabah streptococcosis yang menyerang babi dan kera di Bali pada tahun 1994 (Dartini *et al.*, 1994; Dharma, 1994). Karakterisasi lebih lanjut oleh Utama *et al.* (1998) menunjukkan ada isolat bakteri yang memiliki kapsul pada permukaan selnya dan ada juga yang tidak. Kapsul *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* tersusun atas asam hialuronat dan memiliki sifat mampu melekatkan bakteri (adhesif) pada sel HeLa (Wibawan *et al.*, 1999) serta bersifat antifagositik terhadap leukosit dan monosit babi (Utama *et al.*, 2000).

Penelitian ini bertujuan mengamati kemampuan asam hialuronat sebagai faktor adhesif dari *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* pada epitel buccalis babi. Selain itu, juga bertujuan mencari beberapa monosakarida yang berpeluang memiliki sifat antiadhesif terhadap asam hialuronat kapsul.

METODE PENELITIAN

Penyiapan Suspensi Bakteri

Penelitian ini menggunakan isolat *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* yang didapat atas kebaikan dari Balai Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) Wilayah VI Bali serta isolat yang didapat dari kasus klinis di lapangan (Utama, 1998). Semua isolat telah diuji secara biokimia dan dikarakterisasi lanjut untuk mengamati keberadaan kapsulnya menggunakan mikroskop elektron (Utama, 1998). Untuk tujuan penelitian digunakan tiga isolat berkapsul yang terdiri atas dua isolat asal babi dan satu isolat asal kera. Selain itu juga digunakan tiga isolat bakteri tidak berkapsul yang semuanya berasal dari babi. Bakteri dikultur pada medium Todd Hewitt (Difco, USA) pada suhu 37°C selama 18 sampai 20 jam. Kemudian kultur bakteri dicuci menggunakan larutan garam fosfat setimbang (*phosphate buffered saline* / PBS) 0,14 M

dingin sebanyak dua kali. Endapan kemudian disuspensikan dalam larutan PBS sedemikian hingga mengandung 10^9 sel per ml (Wibawan dan Laemmler, 1990) dan disimpan pada suhu dingin untuk percobaan berikutnya.

Pembuatan Suspensi Epitel Mukosa Buccalis Babi

Epitel mukosa buccalis babi diambil dari babi yang dipotong di Rumah Potong Hewan Kotamadya Bogor dengan cara mengerok rongga mulut babi menggunakan spatel plastik. Epitel disuspensikan dalam larutan PBS 0,14 M (Oxoid, England) dingin dan dicuci sebanyak tiga kali (Utama, 1998). Setelah pencucian, endapan epitel disimpan pada suhu 4°C untuk diberi perlakuan dengan berbagai monosakarida dan asam hialuronat.

Glukosa, N-asetil glukosamin, asam glukuronat (semua bahan buatan Sigma, USA) dan campuran N-asetil glukosamin dan asam glukuronat dilarutkan dalam PBS sehingga masing-masing berkonsentrasi 2%. Disiapkan juga larutan asam hialuronat (Sigma, USA) dengan konsentrasi 0,5% dan 1% dalam larutan PBS. Sampel epitel kemudian disuspensikan dalam berbagai larutan PBS yang telah mengandung monosakarida dan asam hialuronat tersebut, kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Suspensi sel epitel tersebut dicuci menggunakan larutan PBS dan dihitung menggunakan hemositometer (Sigma Co., 1995).

Perlakuan terhadap Sel Bakteri dan Sel Epitel

Disiapkan larutan medium esensial minimal (MEM/Sigma, USA) yang mengandung hialuronidase (Sigma, USA) dengan aktivitas 1000 dan 2000 unit internasional. Suspensi sel bakteri yang mengandung 10^9 sel per ml disentrifus dengan kecepatan 10.000 RPM selama 15 menit, endapannya kemudian diberi perlakuan dengan hialuronidase tersebut dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah itu dilakukan pencucian menggunakan larutan PBS sebanyak dua kali dan kemudian dijadikan konsentrasi seperti semula, yaitu 10^9 sel per ml.

Perlakuan yang diberikan ialah sebanyak satu sel epitel diujiantang dengan 1000 sel *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (Utama, 1998). Ujiantang ini dilakukan baik pada suspensi epitel tanpa preinkubasi dengan monosakarida dan asam hialuronat, maupun suspensi epitel yang telah dipreinkubasi. Ujiantang ini juga dilakukan terhadap suspensi epitel yang tidak di preinkubasi ditantang dengan suspensi sel bakteri yang telah diberikan hialuronidase 1000 dan 2000 unit internasional. Dibuat juga suspensi kontrol yang hanya terdiri dari epitel buccalis babi untuk perhitungan indeks perlekatan.

Suspensi kontrol dan perlakuan kemudian diinkubasikan selama satu jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, disipkan tabung yang telah diisi dengan satu ml. larutan Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Sweden) yang konsentrasinya dibuat menjadi 50% menggunakan larutan PBS. Perlahan-lahan campuran epitel dan bakteri dialirkan melalui dinding tabung sehingga membentuk dua lapisan. Tabung ini kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 RPM selama 10 menit untuk mengendapkan sel epitel dan bakteri yang melekat padanya. Bakteri yang tidak melekat pada sel epitel terdapat di bagian supernatan. Bagian dasar tabung terdiri dari sel epitel dan bakteri yang melekat padanya, ini yang diambil dan dibuat sediaan ulas (Utama, 1998). Dibuat sediaan sama dari semua epitel (baik kontrol maupun perlakuan) dan diwarnai dengan Giemsa. Perhitungan dilakukan dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah bakteri yang melekat (perlakuan)}}{\text{Jumlah bakteri yang melekat (kontrol)}}$$

Hasilnya dinyatakan sebagai indeks perlekatan (Srivastava dan Barnum, 1983), sedangkan analisis data dilakukan dengan prosedur menurut Steel dan Torrie (1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Asam Hialuronat Kapsul sebagai Faktor Adhesif

Kemampuan asam hialuronat kapsul sebagai faktor adhesif *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* tertera pada Gambar 1. Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa bakteri berkapsul mampu melekat pada sel epitel mukosa buccalis babi lebih banyak

jika dibandingkan dengan bakteri tidak berkapsul ($P < 0,01$). Jadi, tampaknya kapsul berperan dalam melekatkan *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* pada sel epitel mukosa buccalis babi. Tabel 1 memperlihatkan bahwa senyawa N-asetil glukosamin, asam glukuronat dan glukosa tidak mampu menghambat peran kapsul dalam melekatkan *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* pada sel epitel yang telah diinkubasikan dengan berbagai larutan monosakarida. Tampaknya proses perlekatan ini dipertani oleh komponen yang berada di kapsul.

Beberapa percobaan sebelumnya menunjukkan bahwa asam hialuronat diduga kuat berperan sebagai komponen perekat tersebut (Soedarmanto *et al.*, 1996; Wibawan *et al.*, 1999). Gambar 2 memperlihatkan kemampuan perlekatan *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* pada epitel yang sebelumnya telah dipreinkubasi menggunakan larutan asam hialuronat 5 dan 10 mg per ml. Dari Gambar 2 jelas bahwa pengaruh inkubasi asam babi menyebabkan penurunan kemampuan melekatnya *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. Hal ini berarti sel epitel tersebut memiliki reseptor asam hialuronat dan reseptor ini telah terisi akibat inkubasi dengan asam hialuronat.

Gambar 3 memperlihatkan pengaruh perlakuan sel bakteri berkapsul dengan hialuronidase terhadap kemampuan melekatnya. Dari Gambar 3 jelas bahwa perlakuan bakteri berkapsul dengan enzim hialuronidase menyebabkan penurunan kemampuan melekatnya pada sel epitel buccalis babi. Gambar 3 juga membuktikan bahwa asam hialuronat memang bertanggung jawab memperantarai proses perlekatan *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. Peran asam hialuronat kapsul bakteri sebagai faktor adhesif pada sel inang telah dikaji pada *Pasteurella multocida* (Esslinger *et al.*, 1992), tampaknya asam hialuronat *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* juga memiliki sifat adhesif sama dengan kapsul *P. multocida*. Sifat ini sangat istimewa dan merupakan faktor virulensi bakteri untuk menghindari sistem imunitas inang dimana asam hialuronat juga dikenal sebagai komponen jaringan hewan dan manusia (Stryer, 1988).

Oleh sebab itu asam hialuronat tidak bersifat imunogenik (Durack, 1989).

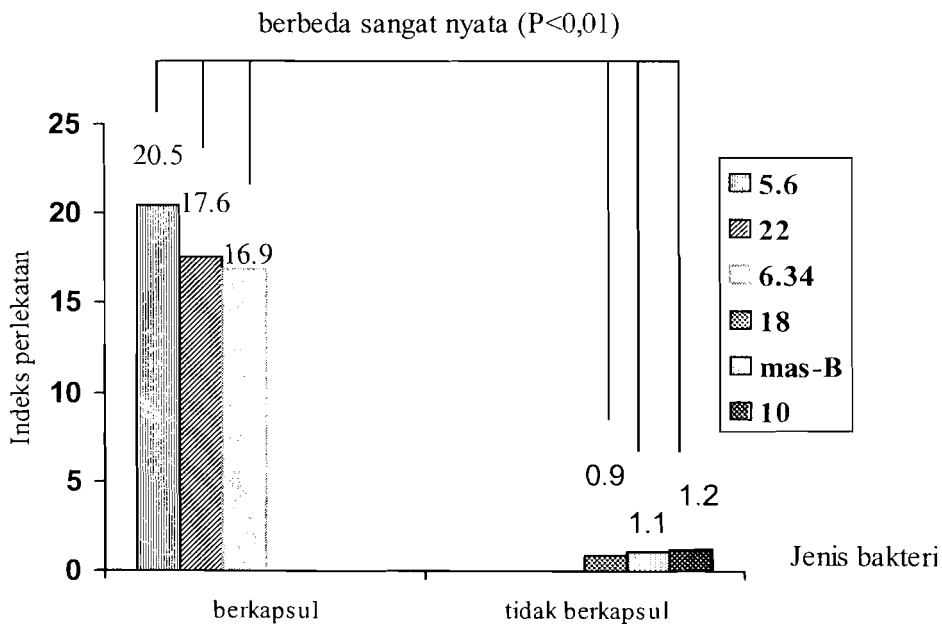
Dari hasil penelitian ini peran asam hialuronat kapsul *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* telah dibuktikan sebagai faktor adhesif yang tidak dapat dihambat oleh monomernya yaitu asam glukuronat dan N-asetil glukosamin pada konsentrasi 2%. Sifat adhesif asam hialuronat kapsul hanya dapat dihambat melalui cara preinkubasi sel epitel mukosa buccalis babi

dengan asam hialuronat, selain itu perlakuan sel bakteri dengan hialuronidase juga menyebabkan hambatan sifat adhesifnya. Karena asam hialuronat juga merupakan komponen jaringan hewan dan manusia, tampaknya fenomena ini merupakan faktor virulensi *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* untuk menghindari sistem pertahanan inang yang diinfeksi.

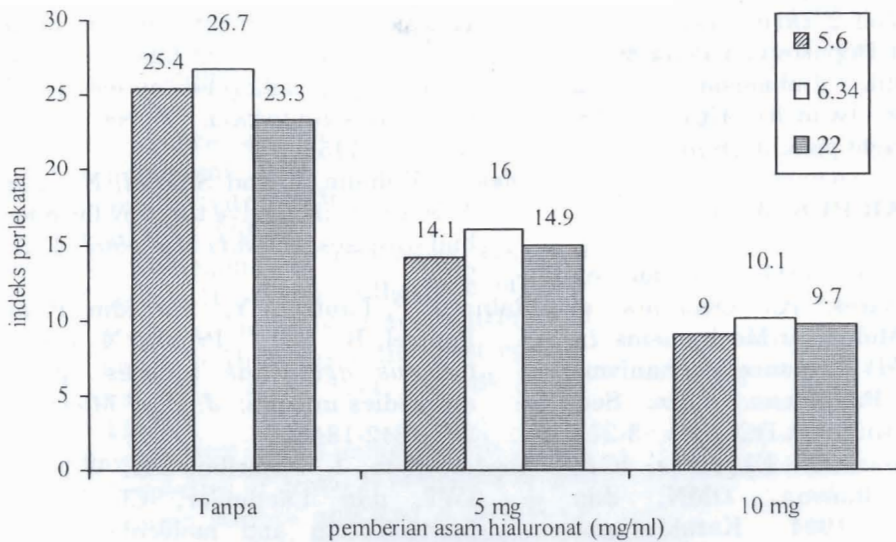
Tabel 1. Indeks perlekatan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* berkapsul pada sel epitel yang telah di preinkubasi dengan larutan berbagai monosakarida

Isolat berkapsul	Sel epitel tanpa preinkubasi	Preinkubasi sel epitel mukosa babi dengan			
		N-asetil glukosamin (NAG) 2%	Asam glukuronat 2%	NAG + asam glukuronat	Glukosa 2%
5,60 (babi)	23,7±1,8 ^{a*}	23,7±3,3 ^a	25,8±4,0 ^a	19,7±2,5 ^a	26,2±4,0 ^a
6,34 (kera)	22,2±2,1 ^a	21,4±2,5 ^a	24,3±3,1 ^a	20,4±1,5 ^a	25,1±2,7 ^a
22,0 (babi)	20,9±2,6 ^a	23,5±3,2 ^a	26,8±2,2 ^a	19,5±2,4 ^a	27,4±3,4 ^a

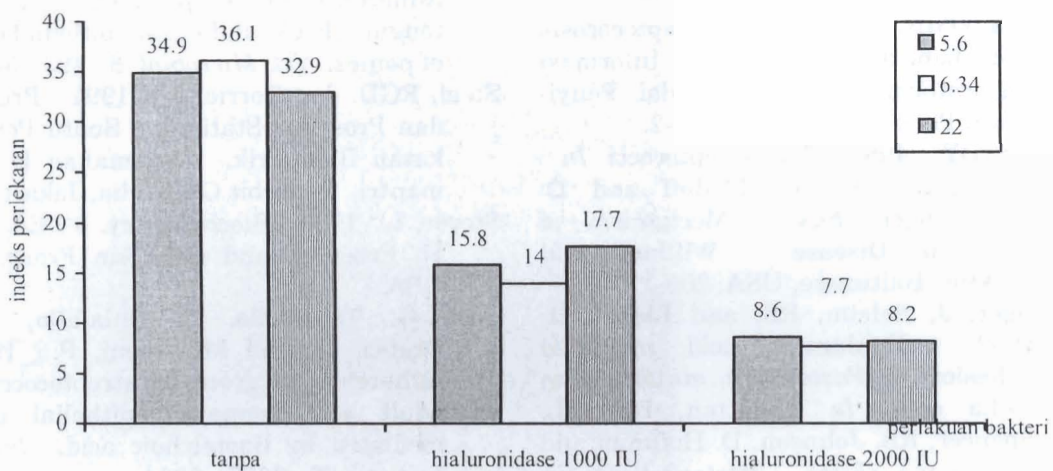
Nilai rata-rata ± galat baku dari 4 ulangan. Tiap ulangan merupakan nilai rata-rata indeks perlekatan bakteri pada 40 sel epitel. Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ke arah kolom atau baris (P>0,05).



Gambar 1. Indeks perlekatan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pada sel epitel mukosa buccalis babi



Gambar 2. Inkubasi sel epitel mukosa buccalis babi dengan asam hialuronat dan pengaruhnya terhadap kemampuan melekat *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pada epitel tersebut



Gambar 3. Perlakuan dengan hialuronidase terhadap *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* berkapsul dan pengaruhnya terhadap indeks perlekatannya pada sel epitel mukosa buccalis babi.

SIMPULAN

Dari penelitian ini jelas bahwa asam hialuronat kapsul *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* terbukti merupakan komponen yang mampu memperantarai perlekatannya pada sel epitel mukosa buccalis babi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kepala Laboratorium Patologi Veteriner dan Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor atas ijin yang diberikan untuk melakukan penelitian ini; teknisi laboratorium saudara Soleh dan Agus Sumantri atas bantuannya selama melakukan penelitian ini; kepada Tim Mana-

jemen Program Doktor (TMPD) dan Proyek Hibah Bersaing VI/1-2 Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia dengan Kepala proyek Dr. Iwan H. Utama, MS, yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arp, LH. 1988. Bacterial infection on Mucosal Surfaces: An Overview of Cellular and Molecular Mechanisms. In Roth, J. A. (Ed) Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Am. Soc. Microbiol. Washington DC, USA : 3-27.
- Dartini, NL, Soeharsono, Ekaputra, IGA, Dibia, N, Dharma, DMN, dan Supartika, KE. 1994. Karakterisasi *Streptococcus* sp yang diisolasi dari letupan penyakit pada babi dan kera di Propinsi Bali. Makalah Kongres XII dan Konferensi Ilmiah VI Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia di Surabaya.
- Dharma, DMN. 1994. Wabah streptococosis pada babi dan kera di Bali. Informasi Laboratorium Veteriner Balai Penyidikan Penyakit Hewan 1/2: 1-2.
- Durack, DT. 1989. The streptococci. In : Schaechter, M., G. Medoff and D. Schlössinger (Eds). Mechanism of Bacterial Disease. William and Wilkins, Baltimore, USA: 205-217.
- Esslinger, J, Seleim, RS, and Blobel, H. 1992. Hyaluronic acid mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells. In : Patten, BE, TL. Spencer, RB. Johnson, D. Hoffman and L. Lehane (Eds). Pasteurellosis in Production Animals. Proceedings of an International Workshop. ACIAR Proceedings No. 43 : 267-273.
- Farrow, JAE. and Collins, MD. 1984. Taxonomic studies on streptococci of serological group C, G and I and possibly related taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* 5 : 483-493.
- Fischetti, VA. 1989. Streptococcal M protein: Molecular design and biological behaviour. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 285-314.
- Mims, CA. 1982. The Pathogenesis of Infectious Disease. Academic Press, London.
- Nealon, TJ. and Matingly, SJ. 1985. Kinetic and chemical analysis of the biologic significance of lipoteichoic acid in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect. Immun.* 50: 107 - 115.
- Ofek, I, Kahane, I, and Sharon, N. 1996. Toward antiadhesive therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* 4: 297-299.
- Rainard, P, Lautrou, Y, Sarradin, P, and Poutrel, B. 1991. Protein X of *Streptococcus agalactiae* induces opso-nic antibodies in cows. *J. Clin. Micro-biol.* 29 : 1842-1846.
- Soedarmanto, I, Pasaribu, FH, Wibawan, IWT, dan Laemmler, Ch. 1996. Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 2201-2204.
- Srivastava, SK, dan Barnum, DA. 1983. Adherence of *Streptococcus equi* on tongue, cheek, and nasal epithelial cells of ponies. *Vet. Microbiol.* 8 : 493 - 504.
- Steel, RGD. dan Torrie, JH. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan B. Sumantri. Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. 3rd Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, USA.
- Teti, G, Tomasello, F, Chiafallo, MS, Orefici, G. and Mastroeni, P. 1987. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* 55 : 3057 - 3064.
- Utama, IH, Girindra, A, Wibawan, IWT, Pasaribu, FH, Setiawan, ED, dan Rompis, ALT. 2000. Respon fagositosis leukosit polimorf babi (in vitro) terhadap *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*. *J. Vet.* 1 : 1-6.
- Utama, IH, Wibawan, IWT, Pasaribu, FH, dan Rompis, ALT. 1998. Studi Respon Imunologis terhadap *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* sebagai landasan pencegahan wabah streptokokosis pada babi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VI/1/1997-1998.
- Utama, IH. 1998. Ekspresi Fenotip dan Aktivitas Biologi Streptokokus Grup C

- Isolat asal Babi dan Kera. (Disertasi) Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Valentin-Wiegand, P, Henn, JG, Chhatwal, GS, Berghaus, GM, Blobel, H, and Preissner, KT. 1988a. Mediation of adherence of streptococci to human endothelial cells by complement S protein (vitronectin). *Infect. Immun.* 56: 2851- 2855.
- Valentin-Wiegand, P, Chhatwal, GS, and Blobel, H. 1988b. Adherence of streptococcal isolates from cattle and horses to their respective host epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1485 - 1488.
- Wibawan, IWT, and Laemmler, Ch. 1990. Properties of group B streptococci with protein surface antigens X and R. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 2834 - 2836.
- Wibawan, IWT., Laemmler, Ch, and Pasaribu, FH. 1992. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1237 - 1242.
- Wibawan, IWT, Pasaribu, FH, Utama, IH., Abdulmawjood, A, and Laemmler, Ch. 1999. The role of hyaluronic capsular material of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in mediating adherence to HeLa cells and in resisting phagocytosis. *Res. Vet. Sci.* 6 : 131-135.
- Wibawan, IWT, Laemmler, Ch, Seleim, RS, and Pasaribu, FH. 1993. A hemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2173-2178