

ISOLAT *Streptococcus agalactiae* ASAL SAPI PENDERITA MASTITIS SUBKLINIS : II. Hidrofobisitas Permukaan Sel Isolat

Streptococcus agalactiae ISOLATES FROM SUBCLINICAL MASTITIS CATTLE : II. Isolate's Cell Surface Hydrophobicity

Iwan Harjono Utama¹, Ninuk Sri Rejeki², I Made Sukada¹, dan
I Wayan Teguh Wibawan²

ABSTRAK

Sebanyak 38 isolat lapang *Streptococcus agalactiae* asal sapi penderita mastitis subklinis di daerah Bogor diamati hidrofobisitas permukaannya menggunakan uji agregasi dengan larutan garam amonium sulfat (SAT) 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 2,5, 3,2, dan 4,0 M. Sebanyak 19 (50 %), 11 (28,9 %), 4 (10,5 %), 3 (7,89 %), dan 1 (2,63 %) isolat dapat diagregasi berturut-turut oleh larutan garam amonium sulfat 0,2, 0,8, 1,6, 2,5, dan 3,2 M. Diperoleh hasil bahwa larutan amonium sulfat 1,6 sampai 2,5 M memiliki kemampuan mengagregasi terbanyak (78,9 %) dari ketiga puluh delapan isolat tersebut.

Kata-kata kunci: *S. agalactiae*, mastitis subklinis, hidrofobisitas permukaan sel

ABSTRACT

Thirty eight *Streptococcus agalactiae* isolates from subclinical mastitis cattle in Bogor were examined for their cellular surface hydrophobicity using salt aggregation test (SAT) ammonium sulphate 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.5, 3.2, and 4.0 M. Nineteen (50 %), 11 (28.9 %), 4 (10.5 %), 3 (7.89 %), and 1 (2.63 %) of isolates could be aggregated by 2.5, 1.6, 0.2, 0.8, and 3.2 M ammonium sulphate solution, respectively. The range concentrations of 1.6 to 2.5 M of ammonium sulphate solution were favourable to characterize the bacteria surface.

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Jimbaran-Bali, INDONESIA

² Laboratorium Patologi Veteriner, Bagian Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA

Key words: *S. agalactiae*, subclinical mastitis, cellular surface hydrophobicity

PENDAHULUAN

Streptococcus agalactiae (grup B menurut Lancefield) telah diketahui sebagai penyebab mastitis subklinis dan sebanyak 30,4 % isolat lapang positif ditemukan bakteri ini (Sukada, 1996). Kemampuan bakteri untuk melekat dan berkolonisasi pada epitel ambing merupakan salah satu sifat virulensi dan patogenitasnya dalam menyebabkan mastitis (Bramley dan Hogben, 1982; Kirk, Degraeves dan Tyler, 1994). Virulensi dan patogenitas *S. agalactiae* berhubungan erat dengan komponen permukaan sel yang dapat diamati dari penampilan fenotip yang dihasilkannya secara *in vitro* (Wibawan dan Laemmler, 1990). Diketahui bahwa sebagian besar isolat (88,9 %) berada dalam dua fase penampilan fenotip yaitu menyebar dan kompak dalam satu media (Utama *et al.*, 1997) dan keadaan ini dikenal dengan fase variasi (Salasia *et al.*, 1994). Wibawan dan Laemmler (1991) menyatakan bahwa bakteri dengan koloni menyebar memiliki kemampuan melekat pada sel ambing relatif kurang baik dibandingkan dengan yang kompak. Koloni menyebar menunjukkan peranan kapsel selama proses infeksi dan mampu menahan serangan makrofag.

Cara lain untuk mengamati karakter permukaan sel bakteri ialah secara kimia dengan menggunakan larutan amonium sulfat dengan konsentrasi tertentu (*Salt Aggregation Test - SAT*) (Kane *et al.*, 1975). Teknik ini sering digunakan dengan hasil yang cukup memadai (Lindah *et al.*, 1981; Wadstrom *et al.*, 1984; Rozgonyi *et al.*, 1985). Oleh karena itu untuk mengamati derajat hidrofobisitas permukaan sel *S. agalactiae* isolat lapang asal sapi penderita mastitis subklinis digunakan juga teknik yang sama.

BAHAN DAN METODE

Isolat S. agalactiae

Sebanyak 38 isolat yang telah diperiksa ulang secara biokimia dan serologi sebagai isolat *S. agalactiae* digunakan untuk penelitian dalam bentuk biakan murni (Yanuarsi, 1994; Sukada, 1996).

Pengamatan Derajat Hidrofobisitas

Satu koloni isolat *S. agalactiae* ditumbuhkan pada tabung berisi 50 ml media kaldu Todd Hewitt (Difco, USA), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam (Wibawan dan Laemmler, 1990). Penampilan fenotip pada media kaldu diamati dan dinyatakan sebagai keruh, sedikit keruh dan jernih (dengan sesedikit mungkin adanya goncangan). Suspensi bakteri dicuci dengan menggunakan larutan penyangga fosfat (PBS) 0,1 M dingin dan dipusing dengan kecepatan 5000 rpm (Sorvall SS-3 automatic, USA) selama 10 menit. Pencucian dilakukan sebanyak dua kali. Selama pencucian disiapkan larutan amonium sulfat dengan konsentrasi 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 2,5, 3,2, dan 4,0 M. Setelah pencucian selesai, pelet tersisa dibuat larutan dengan 0,2 ml larutan PBS 0,05 M untuk diuji.

Pengujian dilakukan dengan mencampurkan masing-masing 25 µl suspensi pelet dan 25 µl larutan amonium sulfat dalam berbagai konsentrasi di atas gelas obyek dan menggoyang-goyangkannya selama satu menit. Hasil positif dinyatakan dengan adanya pembentukan gumpalan seperti pasir dalam waktu satu menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebaran derajat hidrofobisitas isolat *S. agalactiae* tertera pada Tabel 1 di bawah ini. Tabel 1 memperlihatkan bahwa 78,9 % dari isolat yang ada dapat diagregasi oleh larutan amonium sulfat berkonsentrasi 1,6 - 2,5 M, yang berarti sebagian besar derajat hidrofobisitas isolat terdapat di sekitar nilai tersebut. Beberapa peneliti telah melakukan uji ini tanpa disertai keterangan apakah permukaan sel bakteri hidrofobik atau hidrofilik (Lindahl *et al.*, 1981; Wadstrom *et al.*, 1985; dan Rozgonyi *et al.*, 1991). Ljungh *et al* (1985) menyatakan bahwa bakteri dikatakan hidrofobik

ekstrim, jika dapat diagregasi dengan larutan penyangga fosfat berkonsentrasi 0,002 M pada pH 6,8. Wibawan dan Laemmler (1990) menggunakan larutan amonium sulfat 2 M untuk menentukan derajat hidrofobisitas *S. agalactiae*, dan hasil yang diperoleh mendekati hasil penelitian ini sebab sebagian besar isolat lapang (78,9 %) dapat diagregasi oleh larutan amonium sulfat berkonsentrasi 1,6 - 2,5 M.

Tabel 1. Sebaran Derajat Hidrofobisitas *S. agalactiae* Isolat Lapang

Jumlah isolat	Konsentrasi larutan amonium sulfat (M)						
	0,2	0,4	0,8	1,6	2,5	3,2	4,0
1	-	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+

Penentuan derajat hidrofobisitas ditentukan oleh kemampuan amonium sulfat pekat menarik molekul air dan mengendapkan protein (Lehninger, 1990). Permukaan sel bakteri yang terdiri dari banyak protein dan karbohidrat (penyusun kapsel) dengan variasi perbandingan diantara keduanya di permukaan sel, dapat menentukan apakah permukaan sel tersebut mudah atau sulit diagregasi dengan larutan amonium sulfat konsentrasi tertentu. Larutan amonium sulfat encer (<1 M) umumnya dapat mengagregasi permukaan sel bakteri yang kandungan proteinnya lebih banyak, sedangkan permukaan sel yang kandungan karbohidratnya lebih banyak membutuhkan konsentrasi lebih tinggi untuk mengagregasikannya, bahkan sampai di atas 3 M (Rozgonyi *et al.*, 1991; Wibawan dan Laemmler, 1992). Hal ini didasarkan atas sifat karbohidrat polimer yang hidrofilik dan rangkanya lebih tegar jika dibandingkan dengan protein (Lehninger, 1990).

Tabel 2. Hubungan antara Derajat Hidrofobisitas dan Ekspersi Fenotip Isolat pada Media Kaldu

Supernatan	Konsentrasi amonium sulfat (M)		Jumlah isolat
	1,6	2,5	
Keruh	4	10	14
Sedikit keruh	12	8	20
Jernih	2	2	4
Jumlah	18	20	38

Keterangan : P> 0,05

Dari Tabel 2 diperoleh adanya hubungan yang tidak nyata antara derajat hidrofobisitas dan penampilan fenotip di media kaldu. Penyebab hubungan tidak nyata ini adalah susunan sel bakteri yang tumbuh di media cair. Bakteri dengan permukaan sel hidrofobik cenderung membentuk susunan sel berantai panjang (10 sampai 30 sel). Hal ini berakibat kelompok sel berantai panjang cenderung mengendap di dasar tabung sehingga supernatan media cair yang ditumbuhinya jernih. Sebaliknya bakteri berkapsul umumnya memiliki susunan sel berantai pendek (5 sampai 10 sel). Susunan sel seperti ini relatif ringan sehingga tidak semuanya mengendap di dasar tabung (Wibawan, 1997). Selain itu kapsul bakteri yang umumnya elektronegatif akan menghasilkan aksi tolak menolak antar sesama sel (Stryer, 1988). Hal ini menyebabkan media supernatan yang ditumbuhinya menjadi keruh. Penyebab lain tidak nyatanya hubungan tersebut ialah fase variasi yang selalu tampak pada isolat lapang *S. agalactiae* (Salasia *et al.*, 1994). Utama *et al.*, (1997) juga mengamati adanya fase variasi pada bentuk koloni yang muncul jika isolat ditumbuhkan pada agar lunak (*soft agar*). Oleh sebab itu, bakteri yang menampakkan cairan keruh pada media kaldu belum tentu semuanya berkapsul, tapi bakteri yang menampakkan pertumbuhan dengan cairan jernih di media kaldu umumnya tidak menampakkan koloni menyebar pada agar lunak. Fase variasi menyebabkan tidak stabilnya penampilan fenotip isolat, meskipun isolat yang baru diisolasi dari susu sebagian besar memperlihatkan koloni padat (Sukada, 1996). Perubahan penampilan fenotip selama percobaan *in vitro* perlu dipelajari lebih lanjut.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sebagian besar isolat *S. agalactiae* (78,9 %) yang berasal dari sapi penderita mastitis subklinis dapat diagregasi oleh larutan amonium sulfat 1,6 - 2,5 M dan terdapat hubungan tidak nyata antara derajat hidrofobisitas dan penampilan fenotip bakteri pada media kaldu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Drh. Hernomoadi Huminto, M.VSc. Kepala Laboratorium Patologi Veteriner Bagian Parasitologi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan izin penggunaan fasilitas penelitian dan juga kepada Sdr. Agus Sumantri dan Sdr. Soleh sebagai teknisi laboratorium yang telah banyak membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bramley, A.J., and E.M. Hogben. 1982. The Adhesion of Human and Bovine Isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B) to Bovine Mammary Gland and cells. *J. Comp. Path.*, 92:131 - 137.
- Kane, J.A., A.E. Rabkin, and W.W. Karakawa. 1975. Demonstration of Antigens of Bovine Group B Streptococci by Serum Soft Agar Method. *J. Clin. Microbiol.*, 2:35 - 41.
- Kirk, J.H., F. DeGraves, and J. Tyler. 1994. Recent Progress in Treatment and Control of Mastitis in Cattle. *JAVMA*, 204:1152- 1158.
- Lehninger, A.L. 1990. Dasar-Dasar Biokimia. Jilid 1 (diterjemahkan oleh Maggy Thenawijaya). Penerbit Erlangga. Jakarta. 313 pp.
- Lindahl, M., A. Faris, T. Wadstrom, and S. Hjerten. 1981. A New Test Based on Salting Out to Measure Relative Surface Hydrophobicity of Bacterial Cells. *Biochim. and Biophys. Acta.*, 677:471 - 476.
- Ljungh, A., S. Hjerten, and T. Wadstrom. 1985. High Surface Hydrophobicity of Autoaggregating *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Human Infections Studied with Salt Aggregation Test. *Infect. Immun.*, 47:522 - 526.
- Rozgonyi, F., K.R. Szitha, S. Hjerten, and T. Wadstrom. 1985. Standardization of Salt Aggregation Test for Reproducible Determination of Cell-Surface Hydrophobicity with Special Reference to *Staphylococcus* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 59:451 - 457.
- Salasia, S.I.O., I W.T. Wibawan, Ch. Laemmler, and Mat Sellin. 1994. Phase Variation in Streptococci of Serological Group B Characteristic Properties of Isolates from Human and Bovine Infection. *APMIS.*, 102:925 -930.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. W. H. Freeman and Co., New York, USA. : 3-14 pp.

Sukada, I M. 1996. Kejadian Mastitis Subklinik oleh *Streptococcus agalactiae* di Daerah Semplak Bogor dan Pengaruhnya terhadap Kualitas Susu. Thesis Magister Sains. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Utama, I.H., N.S.Rejeki, I M.Sukada, dan I W.T. Wibawan. 1997. Isolat *Streptococcus agalactiae* Asal Sapi Penderita Mastitis Subklinik: I. Ekspresi Fenotip Isolat. *Media Veteriner.*, 4(1):17-24

Wadstrom, T., K.H. Schmid, O. Kuhnemund, J. Havlicek, and W. Kohler. 1984. Comparative Studies on Surface Hydrophobicity of Streptococcal Strains of Grups A, B, C, D, and G. *J. Gen. Microbiol.*, 130:657 - 664.

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., and Ch. Laemmler. 1991. Isolation and Characterization of Group B Streptococcal Type Antigens X and R. *Zbl. Bakt.*, 275:327 - 334.

Wibawan, I W.T. 1997. Komunikasi Pribadi.

Yanuarsi, Y. 1994. Penentuan Serotipe *Streptococcus agalactiae* dari Isolat Lapang. Skripsi Sarjana Kedokteran Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

1. The study was conducted to investigate the effect of either immunization against recombinant cyclic inulin (r-CNH 33) or stimulation with PMSG on the number of follicles available for aspiration in dairy heifers. Twenty four Friesian heifers were randomly allocated to 3 treatment groups; placebo (C, n=7), PMSG (P, 750 IU per week during the 6 week experimental period, n=7) and inulin immunization (I, 230 µg 4 weeks prior to and 250 µg at the start of the experimental period, n=10). During the experimental period, the total number of follicles ≥ 2 mm was not affected by treatment (C=17.0, P=16.0, I=17.6, $P>0.05$) but the inulin immunization increased the number of follicles between 5-9 mm (C=4.2, P=4.1, I=7.1, $P<0.001$) and ≥ 10 mm (C=2.1, P=1.4, I=4.4, $P<0.001$) which enabled more follicles to be aspirated from the 7 heifers (C=2.9, P=3.4, I=12.6, $P<0.001$). As a result, there were fewer follicles 3-4 mm on the ovaries of 1 heifers (C=11.6, P=10.5, I=6.1, $P<0.005$). Immunization against inulin increased the number of medium (5-9 mm) and large (≥ 10 mm) follicles through an increased rate of development of follicles ≥ 2 mm.

Key words: inulin, follicles, immunization, dairy heifers

ABSTRAK

Pencelitan ini ditakukan untuk mengetahui pengaruh imunisasi rekombinan inulin

Paper was presented at The National Scientific Meeting in Veterinary Sciences, Baluwe Bogor, 12-13 March 1996.

Dept. 027 Veterinary Medicine and Family Relations, Faculty of Agriculture, Bogor Agricultural University, Kampus

06615 Bogor