

Diagnosis Infeksi *Streptococcus suis* serotipe-2 pada Babi Secara Serologi dengan *Muramidase Released Protein*

(SEROLOGICALLY DIAGNOSE OF STREPTOCOCCUS SUIS SEROTYPE-2 INFECTION IN PIGS BASED ON MURAMIDASE RELEASED PROTEIN)

¹Siti Isrina Oktavia Salasia*, ²Clara Ajeng Artdita,
¹Mitra Slipranata, ³Sidna Artanto

¹Bagian Patologi Klinik, ³Bagian Mikrobiologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
²Diploma Kesehatan Hewan, Sekolah Vokasi, UGM,
Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281,
Telepon 0274-560861, *E-mail: isrinasalasia@yahoo.com,

ABSTRAK

Streptococcus suis merupakan agen penyebab berbagai penyakit pada babi yang ditandai dengan meningitis, bronkopneumonia, artritis, perikarditis, poliserositis, dan septisemia. Infeksi *S. suis* terutama serotipe-2 bersifat zoonosis, dapat menular pada manusia dengan gejala khas meningitis. Tujuan penelitian adalah melacak infeksi *S. suis* berdasar *muramidase released protein* (MRP), suatu protein penanda virulensi pada *S. suis*. Dalam penelitian digunakan *S. suis* strain referens P171 yang telah diidentifikasi sebagai serotipe-2 dengan fenotipe MRP+EF+. Antigen MRP diekstraksi dengan menggunakan *lysozym* dan diseparasi dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Imunisasi mencit Balb/C dengan antigen MRP digunakan untuk memproduksi antibodi pada mencit dan respons imun mencit dievaluasi dengan *enzyme linkage immunosorbent assay* (ELISA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit Balb/C mampu memproduksi antibodi terhadap MRP dengan absorbansi tertinggi 3,889 dan dapat digunakan untuk mendeteksi serum babi di lapangan dengan pengenceran 200 kali, berdasarkan ELISA *antigen capture*. Antigen dan antibodi terhadap MRP dapat digunakan untuk melacak secara serologi *S. suis* pada babi di Papua, 50% seropositif melalui ELISA *antigen capture* dan 40% melalui uji *dot blot*.

Kata-kata kunci : *S. suis*, serotipe-2, *muramidase released protein*, antibodi, zoonotik

ABSTRACT

Streptococcus suis is a bacterial pathogen causing disease of pigs that characterized by meningitis, bronchopneumonia, arthritis, pericarditis, polyserositis and septicaemia. *S. suis* especially serotype 2 can infect human (zoonotic) with a special symptom of meningitis. The aim of this research was to detect *S. suis* infection based on muramidase released protein (MRP), as an important virulence marker of *S. suis*. *S. suis* serotype 2 strain P171 with phenotype of MRP+EF+ was used in this research. The MRP antigen was extracted using *lysozyme* and separated by using *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Balb/c mice were immunized with 136 kDa MRP to produce antibody against MRP. The antibody was evaluated by using *enzyme linkage immunosorbent assay* (ELISA). The results of the research showed that the antibody against MRP with molecular weight of 136 kDa could be produced on Balb/C mice with the highest absorbance of 3,889 and could be used to detect field sera from infected pigs with 200x dilution using ELISA antigen capture. Antibody against MRP could detect serologically of *S. suis* infection in pigs in Papua with 50% seropositivity by using ELISA antigen capture and 40% by using *dot blot*.

Key words: *Streptococcus suis*, serotype 2, muramidase released protein, antibody, zoonotic

PENDAHULUAN

Streptococcus suis merupakan bakteri Gram positif, berbentuk *coccus*, dengan koloni kecil, *colourless*, bersifat patogen, menyebabkan penyakit pada babi dengan gejala meningitis, bronkopneumonia, artritis, dan kematian terutama pada babi muda (Wisselink *et al.*, 2000; Gottschalk dan Segura, 2000). Bakteri *S. suis* dapat ditemukan pada saluran pernafasan bagian atas, terutama pada tonsil dan rongga hidung, organ genitalia dan saluran pencernaan. Bakteri *S. suis* terdiri dari 35 serotipe (Higgins dan Gottschalk, 2006), dengan serotipe-2 yang paling virulen dan bersifat zoonosis (Higgins dan Gottschalk, 1990; Wertheim *et al.*, 2009).

Wabah infeksi *S. suis* serotipe-2 terjadi di berbagai belahan dunia, pada tahun 1988 di wilayah propinsi Jiangsu Cina dilaporkan 25 kasus pada manusia menyebabkan 14 orang meninggal. Wabah di Sichuan, Cina pada tahun 2005 menyebabkan 38 orang meninggal dunia dari 204 kasus (Lun *et al.*, 2007). Selain itu di Thailand pada tahun 2002, 2005, dan 2007 dilaporkan sebanyak 43 pasien terinfeksi *S. suis*, 16 orang di antaranya mengalami meningitis dan delapan orang yang sembuh dari meningitis mengalami ketulian (Fongcom *et al.*, 2009).

Pada tahun 2009, tercatat 700 kasus infeksi *S. suis* pada manusia terjadi di sebagian besar Asia Tenggara (Wertheim *et al.*, 2009). Semua korban yang sakit dan meninggal dunia adalah para peternak babi, pekerja di tempat pemotongan babi, juru masak yang mengolah daging babi yang terinfeksi, dan warga yang mengkonsumsi daging babi. Gejala-gejala yang tampak antara lain demam tinggi, mual, dan muntah-muntah.

Infeksi *S. suis* diduga sudah menyebar ke Indonesia. Pada tahun 2008 *S. suis* dapat diisolasi pada cairan persendian babi di Timika, Papua (Salasia *et al.*, 2011). Di wilayah Papua, interaksi antara manusia dengan babi sangat erat, babi masih dipelihara secara tradisional dan pengawasan lalu lintas ternak antar daerah masih sangat kurang. Kondisi tersebut memungkinkan terjadinya penyebaran infeksi *S. suis* dan penularan menjadi lebih luas baik dari babi ke babi maupun babi ke manusia. Namun, banyak data ilmiah yang dilaporkan dalam bentuk publikasi.

Muramidase released protein (MRP) dan *extracellular factor* (EF) merupakan dua faktor virulensi yang penting pada *S. suis* dengan

bobot molekul MRP 136 kDa dan EF 110 kDa (Vecht *et al.*, 1992; Salasia *et al.*, 1995; Vecht *et al.*, 1996). Protein MRP dapat dipisahkan dari dinding sel *S. suis*, melalui aktivitas digesti muramidase yang berasal dari dinding sel permukaan bakteri (Vecht *et al.*, 1992). Keberadaan protein EF selalu berkorelasi dengan MRP, namun fungsi protein EF secara pasti belum diketahui dengan jelas. Berdasarkan korelasi protein MRP dan EF, terdapat tiga macam fenotipe dari *S. suis* yaitu MRP+EF+ sebagai faktor virulen yang umumnya diisolasi dari babi sakit, fenotipe MRP-EF- yang biasanya diisolasi dari babi sehat, serta fenotipe MRP+EF- yang dapat diisolasi dari manusia sakit akibat infeksi *S. suis* (Vecht *et al.*, 1992; Salasia *et al.*, 1995; Vecht *et al.*, 1996).

Infeksi *S. suis* serotipe-2 dengan fenotipe MRP+EF+ menunjukkan beberapa gejala klinis spesifik seperti kelainan sistem saraf dan kepincangan setelah infeksi eksperimental, sedangkan strain serotipe-2 dengan fenotipe MRP-EF- tidak menunjukkan gejala tersebut (Vecht *et al.*, 1992). Protein EF hanya terdapat pada bagian supernatan, sedangkan protein MRP secara dominan terdapat pada protoplas, kemungkinan berhubungan dengan peptidoglikan (Vecht *et al.*, 1991). Peranan MRP pada *S. suis* mirip dengan protein M pada *Streptococcus* Grup A yang berperan dalam menghindari sel-sel fagositik dalam sistem pertahanan tubuh inang (Salasia, 1999).

Bakteri *S. suis* yang diisolasi dari babi dan manusia yang terinfeksi, mengandung MRP atau gen *mrp* positif. Dinding sel *S. suis* virulen mengandung gen *mrp* positif yang tidak ditemukan pada *S. suis* yang tidak virulen. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diduga bahwa MRP merupakan faktor virulen dominan yang berperan penting dalam proses patogenesis infeksi *S. suis*. Senyawa MRP merupakan protein transmembran yang merupakan salah satu protein struktural yang dapat memicu respons imun pada inang (Silva *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antibodi yang dikembangkan pada mencit terhadap antigen MRP yang dapat digunakan sebagai sarana deteksi infeksi *S. suis*.

METODE PENELITIAN

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. suis* serotype-2 strain P171 dengan fenotipe MRP+EF+, berasal dari Prof. Dr.

Christoph Lämmler, Institute for Bacteriology and Immunology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, disimpan dalam bentuk liofilisat. Sampel serum babi sebanyak 30 sampel berasal 30 babi dari Papua (Wamena dan Manokwari). Mencit Balb/c sebanyak enam ekor diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada.

Identifikasi *S. suis*

Isolat *S. suis* referens strain P171 dari liofilisat di re-kultur pada medium plat agar yang mengandung 5% darah domba (PAD) dan medium Todd-Hewith *broth* (THB, Pronadisa, Spanyol), diinkubasi selama 24 jam secara anaerob pada suhu 37°C. Identifikasi secara biokimia dilakukan secara konvensional sesuai metode Salasia (1994) dan molekuler untuk identifikasi gen yang bertanggung jawab terhadap MRP (gen *mrp*) dan serotipe-2 (gen *cps2j*) menurut metode Silva *et al.* (2006).

Untuk identifikasi molekuler dilakukan preparasi DNA dengan menggunakan lima sampai sepuluh koloni *S. suis* disuspensikan dengan 180 µL tris-EDTA (TE) buffer dan ditambahkan 20 µL *lysozyme* 10 µg/mL, diinkubasi pada suhu 4°C selama satu jam. Suspensi bakteri ditambahkan 10 µL *mutanolysin* 10 unit/µL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam dalam penangas air/*waterbath*. Suspensi bakteri ditambahkan 25 µL proteinase K dan 200 µL buffer Al (tanpa etanol), kemudian divorteks dan diinkubasi dalam penangas air bersuhu 56°C selama satu jam. Suspensi bakteri ditambahkan 200 µL etanol dan divorteks, dipindahkan ke *DNeasy mini spin column* dan disentrifugasi 8000 rpm selama satu menit. Hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam *DNeasy mini spin* baru kemudian ditambahkan buffer AW1 500 µL dan disentrifugasi selama satu menit. Hasil sentrifugasi dipindahkan kembali ke tabung *DNeasy mini spin* baru dan tambahkan buffer AW2 500 µL dan disentrifugasi 14.000 rpm selama tiga menit. Hasilnya dipindahkan kembali ke tabung *DNeasy mini spin* baru, ditambahkan 100 µL buffer AE, diinkubasikan pada suhu ruang selama satu jam, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Hasil sentrifugasi dipindahkan kembali ke tabung *DNeasy mini spin* baru dan disentrifugasi 12.000 rpm selama tiga menit. Supernatan yang diperoleh ditampung dalam *ependorf* steril dan di

elektroforesis dengan agarose 2%.

Identifikasi molekuler *S. suis* dilakukan berdasar gen yang mengkode daerah kapsula serotipe-2 (gen *cps2j*) dan gen penyandi MRP (gen *mrp*). Primer oligonukleotida yang digunakan dalam proses *polymerase chain reaction* (PCR) berdasarkan sekuen dan program *thermal cycler* yang dilaporkan Silva *et al.* (2006). Urutan oligonukleotida primer dan target gen untuk identifikasi molekuler *S. suis* adalah Cps2 (F) 5'-TTTGTCTGGGAGGGTTACTTG-3' dan Cps2 (R) 5'-TTTGAAGCGATTCATCTCC-3' dengan target gen *cps2j* 498 bp, MRP (F) 5'-ATTGC TCCACAAGAGGATGG-3' dan MRP (R) 5'-TGAGCTTTACCTGAAGCGGT-3' dengan target gen *mrp* 188 bp. Hasil identifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis pada agarose 2% selama satu jam, 300 volt dan divisualisasikan pada UV *transiluminator* dengan panjang gelombang 560 nm.

Preparasi *Muramidase Released Protein* (MRP)

Bakteri *S. suis* P171 ditumbuhkan dalam 100 mL THB dengan *shaker* kecepatan 150 rpm, pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur disentrifugasi, supernatan dibuang, sedimen dicuci dengan 30 mM Tris-HCL pH 8, selanjutnya diresuspensi dengan 30 mM Tris-HCL pH 8, 3 mM MgCl, 25% sukrosa, *lysozyme* (10 mg/mL; Sigma, USA) dan *mutanolysin* (Sigma, USA), kemudian diinkubasi dalam penangas air selama satu jam, pada suhu 37°C. Suspensi disentrifugasi dan supernatan digunakan sebagai antigen (Salasia, 1994). Protein dianalisis menggunakan 10% *sodium dodecyl sulphate* (SDS) *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE).

Penentuan protein MRP dilakukan dengan penghitungan nilai Rf (mobilitas relatif) sehingga didapatkan jarak protein MRP berdasarkan bobot molekul (Mikkelsen dan Cortón, 2004). Protein spesifik dengan bobot molekul sekitar 136 kDa dipotong, kemudian dimasukkan ke dalam kantong dialisis dan ditambahkan 3 mL TBE. *Apparatus* elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* (Uniquip, Unipack 250 *Power supply*) 100 v, 300 mA untuk dielusi sampai protein lepas dari dalam gel (larutan menjadi biru dan gel menjadi transparan), selanjutnya larutan tersebut disimpan pada suhu minus 20°C. Protein hasil elusi diambil 2 µL dan 4 µL, masing-masing ditambahkan 798 µL dan 796 µL aquades

kemudian ditambahkan 200 μ L larutan *Biorad Protein Assay*. Larutan dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Protein tersebut digunakan sebagai bahan untuk imunisasi pada mencit.

Imunisasi pada Mencit

Sebanyak lima ekor mencit galur Balb/C, jantan, berumur empat minggu, diimunisasi dengan antigen yang mengandung MRP dengan konsentrasi 5 μ g per mencit. Sebagai kontrol digunakan satu ekor mencit yang tidak diimunisasi. Imunisasi pertama menggunakan antigen yang diemulsikan dengan *complete Freund's adjuvant* (CFA; Sigma, USA) secara intra peritoneal (IP). Imunisasi diulang dengan interval 10 hari selama tiga kali menggunakan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA; Sigma, USA).

Uji Serologi dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Metode uji serologi yang digunakan adalah ELISA *antigen capture* berdasarkan modifikasi dari Baumgarten (1992) dan Salasia (1994). Setiap sumuran plat mikro di-coating dengan serum yang berasal dari 30 babi asal Papua, masing-masing sebanyak 100 μ L, diinkubasi semalam pada suhu 37°C, kemudian dicuci dengan *washing solution* tiga kali. Sumuran di-blocking dengan 1% *bovine serum albumin* (BSA, Sigma, Jerman) dalam bufer inkubasi, selama satu jam pada suhu 37°C, kemudian dicuci dengan *washing solution* tiga kali. Membran selanjutnya diinkubasi dengan 100 μ L antigen MRP dalam bufer karbonat, selama satu jam pada suhu 37°C, kemudian dicuci dengan *washing solution*. Serum mencit yang mengandung antibodi terhadap MRP dengan nilai absorbansi tertinggi (3,889) ditambahkan kedalam tiap sumuran dengan pengenceran 1/200, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Plat mikro dicuci dengan *washing solution*. Tahap selanjutnya, konjugat (IgG *antimouse alkaline phosphatase*, Sigma, Jerman) yang telah diencerkan dengan bufer inkubasi dengan perbandingan 1:3.000 ditambahkan ke dalam sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah dilakukan pencucian dengan *washing solution*, ke dalam tiap sumuran ditambahkan substrat *4-nitrophenyl-phosphate* (1 mg/mL dalam buffer substrat), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Nilai absorbansi setiap sampel dibaca dengan ELISA reader (Bio-Rad Bench-

mark, Jerman) pada panjang gelombang 405 nm. Kontrol negatif digunakan serum mencit yang tidak diimunisasi MRP. Mengingat bahwa penelitian ini merupakan awal identifikasi infeksi *S. suis* pada babi di Indonesia, belum tersedia serum babi positif.

Uji Serologi dengan *Dot Blot*

Metode *dot blot* yang digunakan merupakan modifikasi dari Salasia (1994). Serum yang berasal dari 30 babi, masing-masing sebanyak 10 μ L diteteskan pada membran nitroselulosa sampai kering, kemudian di-blocking dengan 1% BSA dalam 0,5% Tween-20 dalam Tris-buffer saline (TBS-T) selama semalam pada suhu 4°C. Membran dicuci tiga kali dengan 0,05% TBS-T, kemudian diinkubasi dengan antigen MRP selama satu jam dalam *shaker incubator* 37°C. Setelah dicuci tiga kali dengan 0,05% TBS-T, membran selanjutnya diinkubasi dengan antibodi terhadap MRP (dengan pengenceran 200 kali) selama satu jam dalam *shaker incubator* 37°C, dan dicuci lagi dengan 0,05% TBS-T empat kali. Membran kemudian diinkubasi dalam larutan konjugat (IgG *antimouse alkaline phosphatase*) (Sigma, Jerman) 1:3.000 selama satu jam dalam *shaker incubator* 37°C. Setelah dicuci dengan 0,05% TBS-T dilanjutkan dua kali pencucian dengan TBS tanpa Tween, membran diwarnai dengan substrat BCIP-nitro blue tetrazolium (Sigma, Jerman) dalam buffer substrat pH 9,5. Reaksi dihentikan dengan memasukkan membran nitroselulosa ke dalam aquadestilata apabila sudah terbentuk warna biru. Membran nitroselulosa dikeringkan pada suhu kamar dan dianalisis berdasarkan intensitas timbulnya noktah biru dibandingkan dengan kontrol positif dengan serum mencit yang diimunisasi dengan MRP dan kontrol negatif dengan serum mencit yang tidak diimunisasi MRP. Mengingat bahwa penelitian ini merupakan awal identifikasi infeksi *S. suis* pada babi di Indonesia, belum tersedia serum babi positif. Konfirmasi hasil serologi positif, dilakukan kultur *swab* tonsil babi yang secara serologi positif, melalui identifikasi *S. suis* secara konvensional dan molekuler dengan pembandingan *S. suis* strain referens P171.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi molekuler *S. suis* dilakukan untuk memastikan bahwa strain bakteri yang digunakan adalah serotipe-2 yang dibuktikan

dengan adanya gen kapsuler polisakarida tipe-2 (*cps2j*). Sifat virulensi *S. suis* dibuktikan dengan adanya gen yang bertanggung jawab untuk pembentukan MRP (gen *mrp*). Analisis elektroforesis *cps2j* (498 bp) dan *mrp* (188 bp) pada agarose 2% menghasilkan pita tunggal dengan ukuran yang sesuai untuk *S. suis* (Gambar 1).

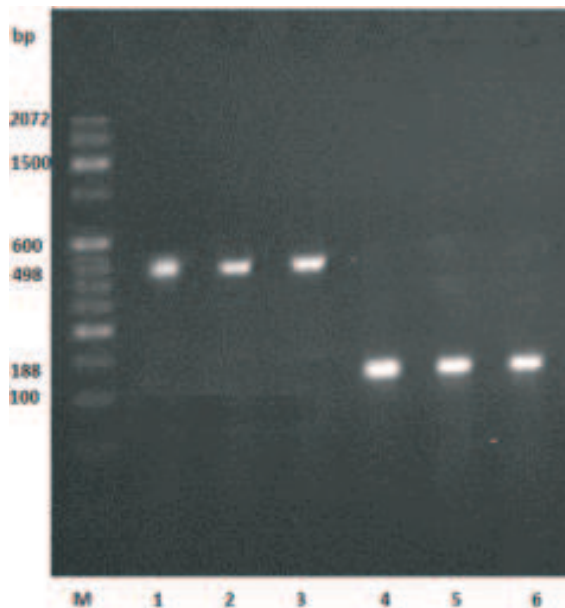
Dari hasil analisis menunjukkan bahwa primer menempel secara spesifik serta terdapat gen yang mengkode *cps2j* dan *mrp* pada *S. suis* P171. Bakteri yang secara biokimia dan molekuler menunjukkan sifat-sifat yang sesuai dengan *S. suis* kemudian dilanjutkan untuk isolasi MRP.

Protein MRP dapat diisolasi dari dinding sel *S. suis* serotipe-2 strain P171 dengan menggunakan enzim *lysozyme* dan *mutanolysin*. Pada Gambar 2 disajikan protein MRP *S. suis* P171 dengan bobot molekul 136 kDa. Bakteri *S. suis* serotipe-2 memiliki protein virulen MRP dengan bobot molekul 136 kDa (Jacobs *et al.*, 1994; Salasia dan Lämmler, 1994). Protein tersebut terdapat pada bagian amplop dinding sel bakteri (*envelope-associated protein*). Oleh karena itu, protein MRP dapat dipisahkan dari dinding sel *S. suis* melalui aktivitas digesti muramidase yang berasal dari dinding sel permukaan bakteri (Smith *et al.*, 1992).

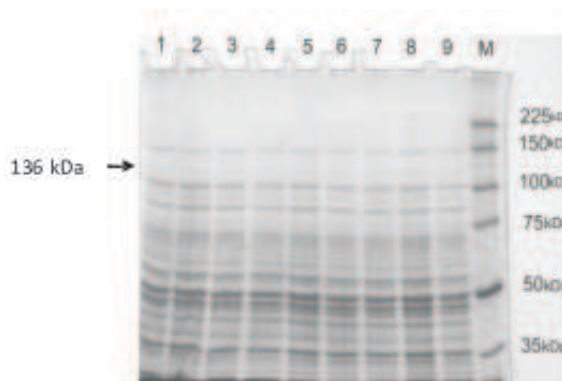
Produksi antibodi terhadap MRP dilakukan dengan imunisasi protein 136 kDa pada mencit Balb/c, diperoleh nilai absorbansi antibodi dengan ELISA seperti disajikan pada Tabel 1.

Pengukuran titer antibodi pada penelitian ini menggunakan antigen MRP sebagai antigen pelapis pada dasar plat, dilanjutkan dengan pemberian antibodi poliklonal anti-MRP hasil imunisasi pada mencit. Ikatan kompleks antigen antibodi yang tidak kuat akan tercuci oleh *washing solution*. Setelah ditambahkan antibodi sekunder IgG *anti-mouse* berlabel alkalin fostatase dan substrat NPP (*4-nitrophenol phosphatase*) akan timbul warna kuning apabila bereaksi dengan enzim. Intensitas warna yang ditimbulkan sebanding dengan jumlah enzim yang diikat dan kadar antibodi yang ingin diketahui (Janeway *et al.*, 2001).

Penggunaan antibodi poliklonal sebagai sarana deteksi memiliki kelebihan karena dapat mengenali berbagai macam epitop antigen, sehingga memiliki toleransi terhadap perubahan yang terjadi pada antigen. Namun, kekurangannya adalah dapat terjadi reaksi silang atau mengenali epitop yang homolog dari spesies/galur yang berbeda (Baumgarten, 1992).



Gambar 1. Hasil visualisasi produk PCR gen penyandi MRP dan serot-pe-2 pada *Streptococcus suis* strain P171; M: marker DNA; 1-3: amplikon gen *cps2j*. (498 bp); 4-6: amplikon gen *mrp* (188 bp).



Gambar 2. Hasil elektroforesis *whole protein S. suis* P171 menggunakan SDS-PAGE 10%, protein MRP dengan BM 136 kDa. Lajur 1-9 = protein P171, M = marker protein (Promega, USA)

Berdasarkan uji statistika t-test dengan CI 0,95 dibuktikan bahwa terdapat perbedaan produksi antibodi yang signifikan ($p < 0,05$) di antara mencit kontrol dan mencit yang diimunisasi dengan protein MRP. Hal ini menunjukkan protein MRP yang diimmunisasikan pada mencit memicu respons sel B untuk memproduksi antibodi.

Dot blot merupakan teknik sederhana

untuk melacak reaksi antigen atau antibodi. Sampel serum ditetaskan pada membran nitroselulose kemudian dihibridisasi dengan *probe antibody*. *Dot blot* memberikan hasil yang bersifat semi kuantitatif yang berbentuk noktah/*spot*. Sensitivitas hasil *dot blot* dapat dibandingkan dengan metode yang lain seperti ELISA (Baumgarten, 1992)

Protein MRP dan serum poliklonal anti-MRP mampu memberikan hasil positif yang nyata untuk mendeteksi serum babi yang terinfeksi *S. suis*, serta memberikan hasil negatif untuk jenis bakteri lain dan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa protein MRP dan serum poliklonal anti-MRP dapat digunakan sebagai sarana pendeteksi yang spesifik untuk infeksi *S. suis*.

Berdasar hasil uji serologi terhadap sampel serum babi di Papua (Wamena dan Manokwari) menunjukkan bahwa sekitar 40% (berdasar uji *dot blot*) dan 50% (berdasar uji ELISA *antigen capture*) positif terinfeksi *S. suis*, karena serum bereaksi positif terhadap MRP. Hasil uji serologi ini memperkuat hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Salasia *et al.* (2011), bahwa wilayah Papua kemungkinan merupakan daerah endemik *S. suis* dengan telah berhasil diisolasi *S. suis* pada cairan persendian babi

pada tahun 2008 di Timika, Papua.

Pada Tabel 2 diperlihatkan sebanyak enam sampel (60%) serum babi asal Wamena seropositif terhadap MRP *S. suis* baik melalui uji *dot blot* maupun ELISA. Namun, hasil uji serologi sampel babi asal Manokwari berdasar uji *dot blot* seropositif sebanyak enam sampel (30%) dan berdasar ELISA tercatat sembilan sampel (45%) seropositif terhadap MRP *S. suis*. Perbedaan hasil uji serologi antara uji *dot blot* dengan ELISA, kemungkinan karena uji *dot blot* kurang sensitif dibanding ELISA. Hal ini karena intensitas warna yang muncul pada uji *dot blot* diinterpretasikan berdasar visualisasi secara individual, sehingga kemungkinan kesalahan lebih tinggi dibandingkan dengan uji ELISA yang mendeteksi keberadaan MRP *S. suis* berdasar absorbansi melalui pembacaan menggunakan alat (ELISA *reader*). Kedua metode, baik *dot blot* maupun ELISA cukup sensitif dan informatif untuk mendeteksi secara serologi keberadaan infeksi *S. suis* berdasar penanda MRP. Sisi sensitif ini dilihat berdasarkan ikatan antigen dan antibodi dibandingkan dengan kontrol mencit non-imunisasi.

Keberadaan *S. suis* di Papua perlu mendapat perhatian serius untuk mencegah penyebaran infeksi ke wilayah lain. Tindakan

Tabel 1. Hasil absorbansi antibodi mencit Balb/c setelah diimunisasi dengan antigen *muramidase release protein* (MRP) *Streptococcus suis* P171 setelah imunisasi ketiga (30 hari dari imunisasi pertama)

Pengenceran Antigen	Mencit 1	Mencit2 2	Mencit3 3	Mencit4 4	Mencit5 5	Mencit kontrol	Kontrol Buffer
50 x	0,679	3,573	1,836	1,673	3,889*	0,703	0,352
100 x	0,478	1,939	0,987	0,958	2,272	0,419	0,305
200 x	0,374	0,963	0,584	0,530	1,037**	0,360	0,420
400 x	0,441	0,645	0,497	0,463	0,688	0,399	0,365
800 x	0,387	0,517	0,764	0,451	0,566	0,427	0,380

Keterangan: * nilai absorbansi tertinggi; **antibodi yang digunakan untuk uji dengan pengenceran 200x.

Tabel 2. Persentase seropositif *Streptococcus suis* pada 30 babi di wilayah Wamena dan Manokwari menggunakan metode *dot blot* dan ELISA *antigen capture*

Wilayah	Jumlah serum babi (sampel)	Seropositif MRP <i>S. suis</i> melalui uji:	
		<i>Dot Blot</i> (%)	ELISA (%)
Wamena	10	6 (60%)	6 (60%)
Manokwari	20	6 (30%)	9 (45%)
Total	30	12 (40%)	15 (50%)

pengecahan di wilayah perbatasan melalui pemeriksaan karantina perlu diperketat. Infeksi *S. suis* serotipe-2, mungkin akan menjadi penyakit yang cukup strategis karena bersifat zoonosis dan menimbulkan kematian cukup tinggi pada manusia dengan gejala meningitis (Wisselink *et al.*, 2000, Lun *et al.*, 2007; Fongcom *et al.*, 2009, Wertheim *et al.*, 2009; Horby *et al.*, 2010).

Infeksi *S. suis* sebenarnya telah dikenal secara luas di negara-negara Eropa, Hong Kong dan akhir-akhir ini ternyata dilaporkan sudah menyebar di Asia Tenggara (Wertheim *et al.*, 2009; Horby *et al.*, 2010). Gejala klinis dan karakter epidemiologi meskipun tampak secara spesifik, namun penyakit ini masih belum familiar dan tidak terdiagnosis, bahkan di kalangan kedokteran manusia kasus ini tidak tercatat (Horby *et al.*, 2010). Melihat fakta di lapangan beberapa peneliti menyatakan bahwa *S. suis* pada manusia kemungkinan tidak terdiagnosis (*underdiagnosed*) karena masyarakat dan petugas kesehatan kurang menyadari adanya risiko penyakit ini dan diagnosis tidak diarahkan pada bakteri ini. Di Indonesia belum berkembang perangkat diagnostik untuk mendeteksi *S. suis* penyebab meningitis. Banyaknya kasus meningitis maupun ketulian di Indonesia kemungkinan karena adanya *underdiagnosed* terhadap infeksi *S. suis*. Fongcom *et al.* (2009) melaporkan tentang kejadian *S. suis* yang menginfeksi penduduk di Thailand Utara. Gejala klinis diawali dengan gangguan sensoneural pendengaran yang parah, kemudian diikuti dengan meningitis. Pasien-pasien, meskipun sudah diobati dengan *penicillin* dosis tinggi atau *cephalosporin* generasi ketiga, masih dapat mengalami tuli secara permanen. Mekanisme kerusakan *cochlear* dan *vestibular* masih belum diketahui dengan jelas, diduga akibat *oto-toxin* yang dihasilkan bakteri. Penyakit ini menjadi risiko bagi pegawai yang berhubungan dengan babi dan menjadi masalah kesehatan masyarakat.

SIMPULAN

Antibodi anti-MRP yang dikembangkan pada mencit mampu mendeteksi keberadaan *S. suis* serotipe-2 secara serologi pada babi dengan ELISA *antigen capture*. Metode *dot blot* cukup sederhana dan sensitif untuk deteksi infeksi *S. suis*, sehingga dapat digunakan sebagai sarana diagnostik dalam kondisi di lapangan.

SARAN

Sarana deteksi yang dihasilkan dalam penelitian ini perlu dikembangkan melalui ELISA kompetitif dengan kontrol babi yang diinduksi dengan *S. suis* MRP+ sebagai kontrol. Hasil uji serologi ini selanjutnya dapat digunakan sebagai studi epidemiologi dan pengendalian infeksi *S. suis* di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian penelitian yang dibiayai oleh Mendikbud melalui Hibah Kompetensi tahun 2012/2013. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Colin Cargill dan Dr. Sukendra Mahalaya dari Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) atas kerjasamanya dalam penelitian dan bantuannya dalam pengiriman sampel *ulas/swab tonsil* dan serum babi dari daerah Papua.

DAFTAR PUSTAKA

- Baumgarten H. 1992. Immunizing mice. Dalam: *Monoclonal Antibody*. Peters J, Baumgarten H. New York, Springer Laboratory. Hlm. 48-49.
- Fongcom A, Pruksakorn S, Netsirisawan P, Pongprasert R, Onsibud P. 2009. *Streptococcus suis* infection : A prospective study in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40(3): 511-517.
- Gottschalk M, Segura M. 2000. The Pathogenesis of the Meningitis Caused by *Streptococcus suis*: The Unresolved Questions. *J Vet Microbiol* 76: 259-272.
- Higgins R, Gottschalk M. 1990. Review article: An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* 2: 249-252.
- Horby P, Wertheim H, Ha NH, Trung NV, Trinh DT, Taylor W, Ha NM, Lien TTM, Farrar J, Van Kinhb N. 2010. Stimulating the development of national *Streptococcus suis* guidelines in Vietnam through a strategic research partnership. *Bull World Health Org* 88: 458-461.

- Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 62 : 1742-1748.
- Janeway CA, Walport PTM, Shlomchick M. 2001. *Immunobiology*. 5th ed. Garland Churchill Livingstone. Hlm. 711-713.
- Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 7: 201-209.
- Mikkelsen SR, Corton E. 2004. *Bioanalytical Chemistry*. Wiley Interscience : a John Wiley and Sons, Inc., Publication. Hlm. 167-171.
- Salasia SIO, Nugroho W, Ruff N. 2011. *Streptococcus suis* infection of pigs in Papua. The International Conference on Natural Sciences (ICONS), Humboldt Kolleg. Malang, July 9-11, 2011.
- Salasia SIO. 1994. Untersuchungen zu Mutmaßlichen pathogenitäts faktoren von *Streptococcus suis*. *Vet Med Diss Justus-Liebig-Universität, Gießen*.
- Salasia SIO, Lämmler C. 1994. Detection of virulence-associated proteins of *Streptococcus suis* by cultivation of the bacteria on nitrosellulose membranes. *Med Sci Res* 22: 347-348.
- Salasia SIO, Lämmler C, Herrmann G. 1995. Properties of *Streptococcus suis* Isolate of Serotype 2 and Two Capsular Mutants. *J Vet Microbiol* 45: 151-156.
- Salasia SIO. 1999. Hubungan antara serotype dan penanda virulen *Streptococcus suis* isolat babi dan manusia. *Hemera Zoa* 81: 1-8.
- Salasia SIO, Nugroho W, Ruff N. 2011. *Streptococcus suis* infection of pigs in Papua. *Humboldt Kolleg-ICONS 2011*. Malang. July 9-11, 2011.
- Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet Microbiol* 115(1-3): 117-127.
- Smith HE, Vecht U, Gielkens ALJ, Smits MA. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* 60: 2361-2367.
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE. 1991. Identification of Two Proteins Associated with Virulence of *Streptococcus suis* Type 2. *Infect Immun* 59: 3156-3162.
- Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk, Smith HE. 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect Immun* 60: 550-556.
- Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. 1996. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pig. *Vet Microbiol* 51: 125-136.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48(5): 617-625.
- Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* 74: 237-248.