

Penggunaan Kultur Makrofag Untuk Pengujian Virulensi *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

(THE USE OF MACROPHAGE CULTURE IN VIRULENCE ASSAY OF
STREPTOCOCCUS EQUI SUBSP. *ZOOEPIDEMICUS*)

IWAN HARJONO UTAMA¹), FACHRIYAN HASMI PASARIBU²),
I WAYAN TEGUH WIBAWAN²) DAN ENDHIE D. SETIAWAN³).

¹. *Laboratorium Biokimia Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana, Jimbaran-Bali.*

E-mail : iwanhu@eudoramail.com; Telp/Fax : 62-0361-701808.

². *Berturut-turut : Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3, Bogor.*

³. *Balai Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata, Bogor.*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengembangkan teknik non invasif dalam menentukan virulensi bakteri. Dalam penelitian ini diuji virulensi *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pada kultur makrofag peritoneal mencit (Kode J 774). Sel bakteri berkapsul dan tidak berkapsul diinokulasikan pada kultur makrofag dengan perbandingan 1000 sel bakteri berbanding satu sel makrofag, kemudian dinkubasikan pada suhu 37°C selama dua dan 18 jam.

Setelah inkubasi, kultur makrofag dicuci menggunakan larutan masin berpenyangga posfat atau *phosphate buffered saline* (PBS) dingin, peletnya diwarnai menggunakan larutan akridin orange 0,5%. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah bakteri hidup dan mati yang terdapat dalam 50 sel makrofag. Data menunjukkan jumlah bakteri tidak berkapsul yang mati lebih banyak ($P < 0,05$) dibandingkan dengan bakteri berkapsul. Kesimpulan : teknik ini dapat digunakan untuk menentukan virulensi bakteri.

Kata kunci : Kultur makrofag, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

J Vet 2001 2 (2) : 44-48

ABSTRACT

This aim of this research was to develop a non-invasive technique for determining bacterial virulence. In this research, the virulence of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* was assayed using mouse peritoneal macrophage culture (code J-774). Encapsulated and nonencapsulated bacteria were inoculated into macrophage cultures with the ratio of 1000 bacteria : 1 macrophage and incubated in 37°C for two and 18 hours.

Macrophage cultures were washed with phosphate buffered saline (PBS) and the cells were mixed with 0.5% acridine orange solution. Live and dead bacteria were assayed within 50 macrophages. The result showed nonencapsulated dead bacteria were significantly higher than those of encapsulated bacteria ($P < 0.05$). The technique therefore could be used in determining bacterial virulence.

Key word : macrophage culture, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

J Vet 2001 2 (2) : 44-48

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Hibah Bersaing VI/1-2/1997-1999 Dirjen Dikti
Makalah ini telah diseminarkan dalam Kongres Nasional 1 Perhimpunan Patobiologi Indonesia, Surabaya 10-12 Nov. 2000.

PENDAHULUAN

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* termasuk streptokokus grup C (SGC) dalam klasifikasi menurut Lancefield (Norcross, 1969; Farrow dan Collins, 1984). Bakteri ini hidup komensal pada berbagai hewan (Moore dan Byrans, 1969), tetapi pada famili *equidae* termasuk patogen dan pada kuda menyebabkan penyakit ingus tenang (Blood dan Radostits, 1989).

Meskipun hidup komensal pada hewan selain kuda, bukan berarti streptokokus grup C tidak mampu menjadi patogen pada hewan-hewan tersebut. Hal ini dibuktikan dengan adanya infeksi *Streptococcus equisimilis* (grup C) pada babi (Woods dan Ross, 1977). Pada tahun 1994 di pulau Bali, saat itu bakteri ini menjadi penyebab wabah streptokokosis pada babi dan menulari kera di berbagai daerah wisata seperti Sangeh dan Alas Kedaton, bahkan meluas ke berbagai daerah di Indonesia (Utama, 1998).

Pengujian postulat Koch dan mikrobiologis mengkonfirmasi bahwa *S.equi* subsp. *zooepidemicus* memang menjadi penyebab wabah streptokokosis pada babi dan kera di Bali (Dibia *et al.*, 1995). Dalam pengujian postulat Koch secara konvensional, umumnya hewan percobaan yang digunakan diinokulasi oleh bakteri sehingga menyebabkan hewan menderita bahkan mati.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji virulensi *S.equi* subsp. *zooepidemicus* (Joly *et al.*, 1992) menggunakan kultur sel makrofag dan melihat kemampuannya membunuh.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan isolat *S.equi* subsp. *zooepidemicus* yang telah

dikarakterisasi sifat biokimiawi dan fenotipnya (Utama, 1998) dan patogenitasnya pada hewan percobaan babi (Dibia *et al.*, 1995). Dalam penelitian ini digunakan dua jenis isolat Sez dengan sifat fenotip berkapsul dan tidak berkapsul serta kultur makrofag peritoneal mencit (Kode J774) yang didapat dari Bagian Mikrobiologi Justus Leibig Universitas Giessen Jerman.

Dalam persiapan pembuatan isolat uji, bakteri (berkapsul dan tidak berkapsul) ditumbuhkan pada 50 ml media cair Todd Hewitt (Difco, USA) selama 18 jam. Kemudian suspensi dicuci menggunakan larutan masin berpenyangga posfat atau PBS dingin (Sigma, USA) 0,14 M dan dipusing dengan kecepatan 10.000 G (Sorval-SS3 Automatic, USA) selama 10 menit. Proses ini diulang sebanyak dua kali. Setelah selesai, dibuat suspensi dengan kandungan 10⁹ sel bakteri/ml (Wibawan dan Laemmler, 1994). Isolat ini siap digunakan sebagai isolat uji.

Kultur makrofag ini dibiakan kembali dalam medium *Minimal Essential Medium* (MEM, Sigma, USA) yang telah dicampur dengan serum anak sapi (*fetal calf serum*, Gibco, USA) 10% dan larutan penisilin-gentamisin (Gibco, USA) agar daya hidupnya terjaga. Suspensi kultur makrofag diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂, setelah tiga hari sel dipanen dan dilakukan pengujian viabilitas menggunakan larutan biru tripan 0,4% (Sigma, USA) serta perhitungan jumlah sel (Cifrian *et al.*, 1994). Pengujian dilakukan dengan mencampur 1000 bakteri dengan satu sel makrofag dan campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama dua dan 18 jam (Wibawan dan Laemmler, 1994).

Setelah inkubasi, suspensi dicuci menggunakan larutan PBS 0,14 M.

dingin. Pelet diwarnai menggunakan akridin oranye 0,5% kemudian dilihat di bawah mikroskop fluoresen. Jumlah bakteri yang mati (berwarna oranye) dan bakteri yang masih hidup (berwarna hijau) yang terdapat di sitoplasma sel makrofag dihitung. Kapasitas fagositosis ditentukan dengan menghitung 50 sel makrofag yang menelan bakteri tersebut. Analisis data menggunakan analisis varians satu arah dan jika hasilnya berbeda nyata dilakukan pengujian lanjut menggunakan kontras orthogonal sesuai dengan prosedur menurut Steel dan Torrie (1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data mengenai kapasitas fagositosis sel makrofag tertera pada tabel dan grafik di bawah ini. Dari data tersebut jelas bahwa jumlah bakteri tidak berkapsul yang mati dalam makrofag lebih banyak daripada bakteri berkapsul ($P < 0,05$). Gambar lebih memperjelas perbedaan tersebut.

Pada pengamatan dua jam pascainkubasi, jumlah bakteri berkapsul yang hidup lebih sedikit dibandingkan

dengan bakteri tidak berkapsul. Meskipun secara statistika tidak berbeda nyata tetapi kecendrungan ke arah itu sudah tampak. Pola serupa juga tampak saat 18 jam pascainkubasi. Hal ini berarti bakteri tidak berkapsul lebih banyak difagosit oleh makrofag, Snipes dan Hirsch (1986) mengatakan kapsul pada *Pasteurella multocida* menyebabkan bakteri sulit diopsonisasi sehingga menghambat proses fagositosis. Kapsul *S. equi* subsp. *zooepidemicus* memiliki komposisi serupa dengan kapsul *P. multocida* (Durack, 1989, Esslinger et al., 1992; Utama, 1998), oleh sebab itu sifat antifagositiknya juga serupa.

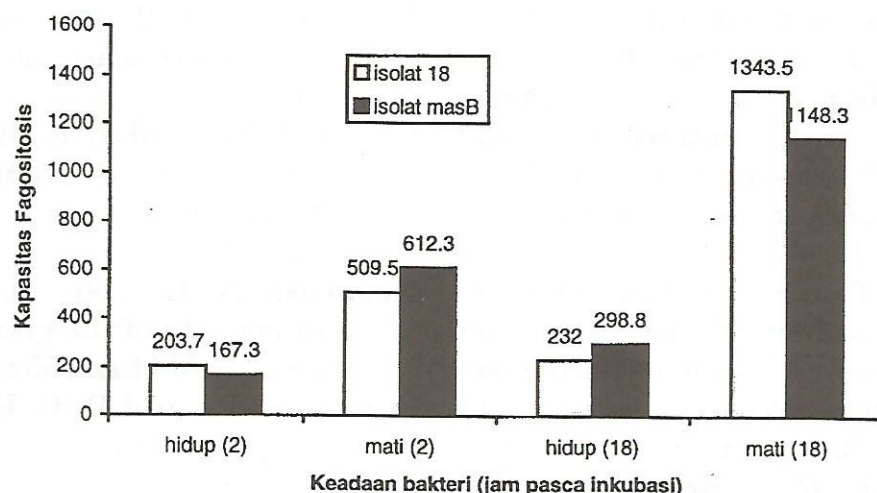
Jika diamati jumlah bakteri yang mati, selama dua jam dan 18 jam pasca inkubasi, bakteri berkapsul lebih sedikit yang mati jika dibandingkan dengan bakteri tidak berkapsul. Hal ini disebabkan bakteri tidak berkapsul memang lebih rentan terhadap daya bakterisidal makrofag jika dibandingkan dengan bakteri berkapsul (Mims, 1982).

Grafik lebih memperjelas perbedaan tersebut dan peningkatan jumlah bakteri yang terbunuh semakin besar seiring dengan lamanya inkubasi ($P < 0,05$).

Tabel. Kapasitas Fagositosis Bakteri Berkapsul dan Tidak Berkapsul oleh Kultur Makrofag J-774.

Lama inkubasi (jam) dan keadaan bakteri	Bakteri berkapsul		Bakteri tidak berkapsul	
	Kode 5.60	Kode 6.34	Kode 18	Kode Mas B
2 (hidup)	165,5 + 20,3a	97,0 + 6,8 a	203,7 + 43,9 a	167,3 + 14,6 a
2(mati)	67,8 + 12,8 a	35,8 + 2,7 a	509,5 + 61,9 b	612,3 + 35,4 b
18 (hidup)	64,7 + 6,9 a	101,5 + 10,2 a	232,0 + 29,8 a	298,8 + 23,0 b
18 (mati)	39,8 + 7,5 a	35,3 + 3,9 a	1343,5 + 132,1 b	1148,3 + 41,9 b

Keterangan : Data dalam nilai rata-rata ± galat baku (4 ulangan)
Adanya huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) ke arah baris



Gambar. Grafik Kapasitas Fagositosis *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* oleh Kultur Makrofag J-774.

Causey *et al.*, (1995) mengatakan kapsul berperan membantu bakteri tetap hidup dalam makrofag dan hasil ini juga didukung oleh hasil penelitian Indriastati (1996) yang mengatakan jumlah bakteri berkapsul lebih sedikit terbunuh oleh sel polimorf yang berasal dari darah segar monyet ekor panjang. Tampaknya data penelitian ini menunjang sifat-sifat kapsul yang didiskripsikan di atas.

Meskipun belum ada data pasti untuk menyatakan virulensi bakteri secara *in vitro*, penelitian ini dapat menunjukkan bahwa teknik noninvasif bisa digunakan untuk menentukan virulensi bakteri. Meskipun demikian masih perlu penelitian lanjut untuk mencari nilai patokan mengenai virulensi bakteri dan mikroba lainnya secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Tim Hibah Bersaing atas dana yang diberikan untuk penelitian ini, selain itu juga ucapan terima kasih ditujukan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Kepala Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran

Hewan Institut Pertanian Bogor. Kepada Balai Penelitian Veteriner juga diucapkan terima kasih atas bantuan referensinya, juga kepada Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah VI Denpasar atas isolat streptokokus yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Blood, D. C., and O. M. Radostits. 1989. *Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses*. 7th. Ed. Bailliere Tindall. Philadelphia, USA.
- Causey, R. C., D. L. Paccamonti, and W. J. Todd. 1995. Antiphagocytic properties of uterine isolates of *Streptococcus zooepidemicus* and mechanisms of killing in freshly obtained blood of horses. *Am. J. vet. Res.* 56 : 325-328.
- Cifrian, E., A. J. Guidry, C. N. O'Brien, J. E. Keys, and W. W. Marquardt. 1994. Bovine mammary teat and ductal epithelial cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* 55 : 239-246.

- Dibia, N., S. Amintorogo, A. A. G. Putra, L. Dartini, dan K. E. Supartika.** 1995. Epidemiologi and gejala klinis streptococcosis pada babi di Propinsi Bali. *Bul. Vet. Balai Penyidikan Penyakit Hewan VI. VIII / 43 : 1 - 17.*
- Durack, D. T.** 1989. The Streptococci. In : Schaechter, M., G. Medoff and D. Schlessinger (Eds.) *Mechanism of Bacterial Disease.* William and Wilkins, Baltimore, USA. : 205 - 217.
- Esslinger, J., R. S. Seleim, and H. Blobel.** 1992. Hyaluronic acid mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells. In : Patten, B. E., T. L. Spencer, R. B. Johnson, D. Hoffman, and L. Lehane (Eds.) *Pasteurellosis in Production Animals. Proceedings of an International Workshop. ACIAR Proceedings No. 43. : 40 - 43.*
- Farrow, J. A. E., and M. D. Collins.** 1984. Taxonomic studies on streptococci of serological group C, G, and possibly related taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* 5 : 483 - 493.
- Indriastati, S. A.** 1996. Aspek Zoonosis *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* asal Wabah Penyakit Babi. Thesis Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Joly, V., J. Bolard, and P. Yeni.** 1992. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 1799-1804.
- Mims, C. A.** 1982. The pathogenesis of Infectious Disease. Academic Press, London.
- Moore, B. O., and J. T. Byrans.** 1969. Antigenic classification of group C animal streptococci. *J.A.V.M.A.* 155 : 416 - 421.
- Norcross, N. L.** 1969. Comments on antigenicity of the group C streptococci. *J.A.V.M.A.* 155 : 414 - 415.
- Snipes, K. P., and D. C. Hirsch.** 1986. Association of complement sensitivity and virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Avian Dis.* 30 : 500 - 504.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie.** 1989. Prinsip and Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan : B. Sumantri. Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Utama, I. H.** 1998. Ekspresi Fenotip and Aktivitas Biologi Streptococcus Grup C Isolat asal Babi and Kera. Disertasi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wibawan, I W. T., and Ch. Laemmler.** 1994. Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Med.* B-41 : 453 - 459.
- Woods, R. D., and R. F. Ross.** 1977. Immunogenicity of experimental *Streptococcus equisimilis* vaccines in swine. *Am. J. Vet. Res.* 38 : 33-36.