

# PROTOTYPE KIT DIAGNOSTIK UNTUK DETEKSI STREPTOKOKOSIS PADA PRIMATA DENGAN ELISA A-ANTIBODI MONOKLONAL PENANGKAP ANTIGEN

## PROTOTYPE DIAGNOSTIC KIT TO DETECT STREPTOCOCCOSIS IN PRIMATES USING ELISA-MONOCLONAL ANTIBODY ANTIGEN CAPTURE

Siti Isrina Oktavia Salasia<sup>1)</sup>, Aris Purwantoro<sup>1)</sup> dan Khusnan<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2, Karang Malang, Yogyakarta 55281, E-mail: [isrinasalasia@yahoo.com](mailto:isrinasalasia@yahoo.com) <sup>2)</sup>Akademi Peternakan Brahmputra, Yogyakarta

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengembangkan sarana diagnostik untuk kontrol streptococcosis pada primata dengan *ELISA-monoclonal antibody* penangkap antigen *M-like protein* (MLP) *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* grup C (SGC). *M-like protein* SGC diekstraksi dengan menggunakan lisozim dan N-asetilmuramidase. Protein dengan besar sekitar 58 kDa digunakan sebagai antigen untuk menimbulkan antibodi pada mencit Balb/c. Mencit yang mengandung antibodi dengan absorbansi tertinggi (2,868) diambil limpanya untuk memperoleh limfosit imun (limfoblast). Hasil fusi sel mieloma dan limfoblast diperoleh 4 klon hibridoma yang positif mengandung antibodi terhadap MLP, dengan nilai absorbansi pada ELISA masing-masing 1,900, 1,963, 1,895 dan 2,050. Hasil propagasi cairan asites mencit Balb/c diperoleh monoklonal antibodi terhadap MLP *S. equi* subsp. *zoepidemicus* dengan nilai absorbansi dan konsentrasi sebagai berikut: asites 1 = 1,597 (5,50 mg), asites 2 = 1,940 (5,75 mg), dan asites 3 = 3,012 (5,80 mg). Antibodi monoklonal memperlihatkan spesifitas yang cukup tinggi karena hanya mengenal 1 epitop spesifik yang diperlihatkan pada uji *Western blot* dengan menampakkan pita tunggal pada sekitar 58 kDa dan menunjukkan reaksi positif pada uji *dot-blot*. Antibodi monoklonal memperlihatkan sensitifitas yang cukup tinggi setelah diuji dengan serum hewan percobaan tikus yang diinfeksi buatan dengan *S. equi* subsp. *zoepidemicus* dengan hasil absorbansi pada uji ELISA lebih dari 1,00 dan menunjukkan reaksi positif pada uji *dot-blot*. Hasil uji terhadap sampel serum *Macaca fascicularis* menunjukkan bahwa 97,56% positif.

**Kata kunci:** *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, antibodi monoklonal, *M-like protein*, primata

### ABSTRACT

The aims of the research were to develop diagnostic methods for control streptococcosis on primates using *ELISA-monoclonal antibody* against *M-like protein* (MLP) of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* serogroup C (SGC). The MLP-antigen of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* isolated from monkey was extracted with the lysozym and N-acetylmuramidase. The 58 kDa protein was used to develop antibody of Balb/c mice. Mice with a highest absorbance (2.868) was used as probe to develop monoclonal antibody against MLP. Spleen cells derived from this mice was fused with the myeloma cells after the logarithmic growth phase. The fusion of myeloma cells and limfoblast resulted 4 clones hybridoma positive for antibody production against antigen MLP with the absorbance ELISA values of 1.900, 1.963, 1.895 and 2.050. The monoclonal antibody against *M-like protein* of *S. equi* subsp. *zoepidemicus* could be produce from the ascites Balb/c mice with the titer and protein concentration of ascites 1 = 1.597 (5.50 mg), ascites 2 = 1.940 (5.75 mg), and ascites 3 = 3.012 (5.80 mg). In the *Western blot* analysis could be observed a specific single band of about 58 kDa indicated that the antibody reacted specifically with MLP of *S. equi* subsp. *zoepidemicus*. On the *dot-blot* assay showed that the monoclonal antibody reacted strongly with the antigen. Monoclonal antibody could detect the MLP-antigen capture of infected rat with the titer of more than 1.00, and reacted positive on the *dot-blot* assay. The ELISA of sera of *Macaca fascicularis* revealed that 97,56% positive.

**Key words:** *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, monoclonal antibody, *M-like protein*, primates

## PENDAHULUAN

Di Indonesia sedikitnya terdapat 35 jenis satwa primata, dan dari sekian jenis tersebut ada yang digolongkan kedalam beberapa kriteria perlindungan satwa, yang pada umumnya didasarkan pada estimasi populasinya di alam (Sajuthi, 1998). Permasalahan yang dihadapi mengenai satwa primata yaitu kecenderungan terjadinya penurunan populasi di alam dikarenakan habitat yang semakin terdesak oleh kepentingan manusia, kerusakan habitat seperti kebakaran hutan, pembukaan hutan untuk pemukiman, penangkapan satwa liar yang tidak terkendali (Sajuthi, 1998). Faktor lain yang tidak dapat dipungkiri adalah terjadinya kasus penyakit yang menyerang satwa primata. Pada tahun 1994 di Bali terjadi kematian ratusan kera-kera yang hidup di hutan wisata alam, dengan angka kematian sekitar 5,6-15% (Dharma dkk., 1994), dengan perincian di Sangeh 15%, Padang Tegal 9% dan Alas Kedaton 5,6%, prevalensi penyakit tercatat 80%. Angka kematian tersebut kemungkinan lebih tinggi, karena adanya kematian kera yang tidak tercatat, terbukti dengan adanya bau bangkai di hutan dan bangkai kera yang hanyut di sungai. Penyebab wabah dan kematian kera-kera di hutan wisata alam Bali adalah *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* yang termasuk grup C menurut klasifikasi Lancefield (Soedarmanto *et al.*, 1996). Penyakit ini dapat menginfeksi manusia (mempunyai potensi zoonosis), mengingat kera sebagai primata dapat terinfeksi, karena kuman tersebut dapat difagosit oleh sel-sel PMN leukosit manusia dan dapat beradesi dengan sel-sel epitel *buccalis* manusia maupun kera (Salasia, 1996; Himawan dan Salasia, 2001).

Untuk pencegahan terhadap berkurangnya populasi akibat suatu penyakit, perlu dikembangkan sarana diagnosis untuk deteksi dan pencegahan streptococcosis yang sampai saat ini diperkirakan masih merupakan ancaman yang mengkhawatirkan. Sarana diagnosa yang paling sensitif dan spesifik untuk deteksi penyakit maupun pembawa

penyakit tersebut adalah ELISA antigen M-like protein (MLP) dengan menggunakan antibodi monoklonal. Protein M-like dipilih sebagai protein virulen berdasar penelitian yang telah dilakukan terhadap *S. equi* subsp. *equi* pada kuda dan *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pada kuda (Timoney *et al.*, 1994; Timoney *et al.*, 1995). *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pada kera maupun babi sangat jarang ditemukan, infeksi SGC ini pada kera dan babi kemungkinan baru pertama kali ini ditemukan (Soedarmanto *et al.*, 1996). Protein protektif yang tersedia, diharapkan dapat digunakan untuk mencegah berkembang/menularnya penyakit tersebut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan sarana diagnostik untuk kontrol streptokokosis. Sarana diagnosis ini sangat berguna untuk menghindarkan penyebaran penyakit streptokokosis. Adanya bukti bahwa kuman SGC yang mewabah pada tahun 1994 kembali dapat ditemukan pada babi yang secara klinis sehat pada tahun 1998 (Salasia *et al.*, 2002) menandakan adanya bahaya hewan *carrier* yang dapat mengancam populasi kera dan manusia di sekitarnya.

## MATERI DAN METODE

### Isolat *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Digunakan kultur streptokokus dari 3 isolat kera (6.70, 6.72, dan 6.73) yang diperoleh dari BPPH VI Denpasar. Sebagai pembanding digunakan 1 isolat babi dari Abatoar di Bali tahun 1998 (01) dan 1 isolat asal wabah babi tahun 1994 (6.4a).

Bakteri ditanam pada plat agar darah (PAD) yang terdiri dari *blood agar base* (Oxoid), dengan menggunakan darah domba, dan dalam media cair *Todd-Hewitt broth* (THB; Oxoid), diinkubasi selama 24 jam pada 37°C.

### Isolasi M-like Protein

Isolasi dan purifikasi protein M-like (MLP) dilakukan dengan mengacu pada metode Timoney *et al.* (1995 dan 1994). Kuman SGC isolat kera ditumbuhkan dalam 100 mL *Todd-Hewitt broth* (THB, Oxoid, Wesel, Germany) semalam pada suhu 37°C. Kultur bakteri

disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Pelet bakteri dicuci dua kali dengan 20 mM bufer fosfat (pH 7), kemudian disuspensi dengan 1 mL 0,5 M bufer fosfat (pH 6) yang berisi 10 mg *lysozyme* (Sigma, Deisenhofen, Germany), 30  $\mu$ g *N-acetylmuramidase* (Sigma,) dan 0.5 M sukrose (Merck, Darmstadt, Germany). Suspensi bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit, supernatan digunakan sebagai antigen MLP. Antigen MLP tersebut kemudian dianalisis dengan 10% *sodium dodecylsulphate* (SDS)-*polyacrylamid gel electrophoresis* (PAGE) dengan alat elektroforesis (Mini Protean, Fa. Bio Rad, Richmond, USA) protein dengan berat molekul sekitar 58 kDa digunakan sebagai antigen untuk imunisasi mencit Balb/c.

#### Imunisasi Mencit

Digunakan 10 ekor mencit balb/c betina umur sekitar 4 minggu. Imunisasi dilakukan dengan antigen MLP dengan dosis 25  $\mu$ g per ekor mencit. Imunisasi pertama, antigen dicampur dengan *Freund's complete adjuvant*, kemudian disuntikkan secara intraperitoneal. Pada minggu ke 2, 3, 4, diulang dengan antigen dicampur *Freund's incomplete adjuvant*. Keberhasilan imunisasi dilihat dengan adanya antibodi terhadap antigen MLP, dengan *enzyme immunosorbent assay* (ELISA) 2 minggu setelah booster protein bakteri. Dalam uji ELISA digunakan antigen MLP untuk *coating* sumuran plat mikro. Mencit dengan titer antibodi yang tinggi, limpa dipanen untuk memperoleh limfosit imun (limfoblast) (Salasia, 2001; Peters *et al.*, 1985).

#### Preparasi Limfosit dari Limpa

Mencit Balb/c yang telah diimunisasi dan dibooster antigen selama tiga hari berturut-turut, diambil darah sebanyak-banyaknya untuk mendapatkan antiserum spesifik. Pengambilan darah juga dimaksudkan untuk mengurangi populasi eritrosit dalam limpa. Mencit dietanasi dengan menggunakan eter, kemudian dilakukan nekropsi dengan cara membuka kulit didaerah perut. Limpa diambil secara aseptis dimasukkan

dalam cawan petri yang telah diberi *phosphate buffer saline* (PBS) steril. Limpa diambil limfositnya dengan cara dibuat irisan superfisial sepanjang sisi limpa dan dengan *dysposable syringe* limfosit dalam limpa dipanen dengan cara menyemprotkan medium RPMI ke dalam limpa sampai limfosit keluar dari limpa. Limfosit yang keluar dari limpa dipindahkan kedalam tabung sentrifus 50 ml dan dilakukan sentrifugasi. Supernatan diambil dan endapan sel dicuci dengan RPMI 3 kali. Limfosit disuspensikan dalam RPMI kemudian dihitung dengan menggunakan hemositometer (Peters *et al.*, 1985).

#### Fusi Limfosit dan sel Mieloma

Sel mieloma dipersiapkan beberapa hari sebelum fusi dalam kondisi segar, kemudian difusikan dengan limfosit dalam tabung 50 mL dengan jumlah sama (1:1). Campuran sel disentrifus 400xG selama 5 menit, supernatan diambil sampai benar-benar kering. Dengan menggunakan *dysposable syringe* 1 mL ditambahkan 0,8 ml 40% *polyethyleneglycol* (PEG). Setelah dibiarkan 1 menit, ditambahkan 1 mL medium RPMI tanpa serum. Selanjutnya ditambahkan lagi 20 mL medium RPMI tanpa serum sedikit demi sedikit selama 5 menit dengan hati-hati agar tidak menyebabkan sel yang sedang fusi terlepas. Suspensi sel dan sel hibrid disentrifugasi 400xG selama 10 menit, supernatan diambil kemudian ditambahkan 19 mL medium penumbuh dengan hati-hati dengan medium *hypoxanthine aminopterin thymidine* (HAT) yang berisi 10% *calf foetal serum*, penisillin 100 unit/mL, streptomisin 100  $\mu$ g/mL, amfoterisin B 0,25  $\mu$ g/mL, gentamisin 50  $\mu$ g/mL. Suspensi sel sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan dalam pelat mikro (digunakan 3 pelat mikro), kemudian diinkubasikan dalam CO<sub>2</sub> inkubator semalam (Peters *et al.*, 1985).

#### Seleksi Hibridoma Penghasil Antibodi

Penggantian medium dilakukan setiap 2 atau 3 hari sekali, sambil dilakukan pengamatan terbentuknya koloni hibridoma. Sumur dengan koloni hibridoma yang cukup besar diuji adanya antibodi anti MLP dengan ELISA, pada hari ketiga setelah penggantian

medium. Kultur sel dalam sumur yang menghasilkan antibodi dipindahkan dalam pelat mikro 24 sumuran untuk dikembangkan lebih lanjut. Hibridoma yang tumbuh dengan memproduksi antibodi dilakukan kloning, sebelum dilakukan kloning, medium diganti dengan medium penumbuh (Peters *et al.*, 1985).

#### **Cloning Hibridoma**

Hibridoma yang menghasilkan antibodi monoklonal diklon dengan metode limiting dilution. Klon yang diperoleh ditumbuhkan dalam jumlah yang cukup dalam flask dengan medium penumbuh dan diusahakan memperoleh lebih dari 100 klon. Sebagian hibridoma disuntikkan kedalam ruang peritoneal mencit Balb/c untuk memperoleh monoklonal antibodi dalam jumlah banyak (Peters *et al.*, 1985). Untuk deteksi hibridoma penghasil antibodi terhadap MLP digunakan metode ELISA.

#### **Propagasi Klon Hibridoma**

Propagasi klon hibridoma dilakukan secara *in vivo* dengan menyuntikkan hibridoma secara intraperitoneal pada mencit Balb/c. Sebelumnya mencit disuntik dengan Pristane untuk menekan respon imun normal, kemudian mencit diinjeksi secara intraperitoneal dengan klon hibridoma sebanyak kira-kira  $5 \times 10^6$  sel/mL. Cairan asites yang diperoleh selanjutnya diuji dengan ELISA (Peters *et al.*, 1985).

#### **Purifikasi MAB**

Cairan asites ditambahkan dengan amonium sulfat jenuh (45%) (v/v), diaduk selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada 1.000xG selama 15 menit pada 4°C. Endapan dicuci dengan PBS, kemudian disentrifugasi 5.000xG selama 15 menit pada 4°C. Supernatan dipindahkan ke tabung bersih dan diendapkan lagi dengan amonium sulfat jenuh 40%, kemudian disentrifugasi 1.000xG, selama 15 menit pada 4°C. Endapan dilarutkan dengan 0,5 mL PBS, kemudian didialisis dengan 1 L PBS semalam pada 4°C. Setelah sentrifugasi 5.000xG, selama 15 menit pada

4°C, supernatan disimpan sebagai MAB dan disimpan pada -70°C (Peters *et al.*, 1985).

#### **Immunoblotting**

Protein *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (MLP) diperbanyak untuk dipergunakan sebagai antigen untuk uji laboratorik maupun uji lapangan terhadap monoklonal antibodi. Untuk analisis Western blot, protein hasil SDS-PAGE yang terdapat pada gel yang belum diwarnai, ditransfer pada membran nitroselulose (Biorad Laboratories, USA). Membran diblokir dengan *bovine serum albumin* (BSA) 1% semalam pada 4°C, membran kemudian dicuci dengan 0,05% Tween dalam *tris buffer phosphate* (TBS). Blot kemudian diinkubasi dengan larutan monoklonal antibodi 1:500, selanjutnya divisualisasikan dengan penambahan konjugat *anti-mouse alkaline phosphatase* (Sigma) atau *anti-rat alkaline phosphatase* (untuk sampel serum tikus) dan *anti-monkey alkaline phosphatase* (untuk sampel serum kera) yang dilarutkan dengan PBS (1:3.000). Setelah pencucian 2 kali dengan 0,05% Tween dalam TBS dan 2 kali pencucian dengan TBS tanpa Tween, membran selanjutnya diwarnai dengan substrat 33  $\mu$ L BCIP dan 66  $\mu$ L NBT dalam 10 ml bufer substrat pH 9,5 (Salasia, 2001). Secara paralel dilakukan uji *dot blot* dengan cara meneteskan antigen pada membran nitroselulose dengan menggunakan antibodi yang diuji, visualisasi warna pada *dot blot* dilakukan seperti pada proses *immunoblotting* (Salasia, 1994).

#### **Uji Sensitivitas MAB**

Antibodi monoklonal yang diperoleh diuji sensitivitasnya secara laboratorik dengan menggunakan hewan percobaan tikus yang diinfeksi dengan SGC. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolat kera ditanam dalam *Todd Hewitt broth* (THB) selama 24 jam pada 37°C. Kultur SGC disentrifugasi dengan kecepatan 5.000xG selama 15 menit, kemudian dilarutkan dalam PBS pH 7,5 dan diukur OD nya antara 0,50-0,55 dengan menggunakan spektrofotometer (Spectronic 21) pada  $\lambda$  540 nm. Larutan bakteri ini diinfeksi pada 4

Tabel 1. Hasil uji ELISA dan *dot blot* serum tikus percobaan yang diinjeksi dengan kultur kultur *S. equi* subsp. *zooepidemicus* dengan pengenceran serum 100x

No. Tikus percobaan	Nilai Absorban	Hasil reaksi <i>dot-blot</i>
1.	1,113	+
2.	1,018	+
3.	1,056	+
4.	1,007	+
5. *	0,865	-

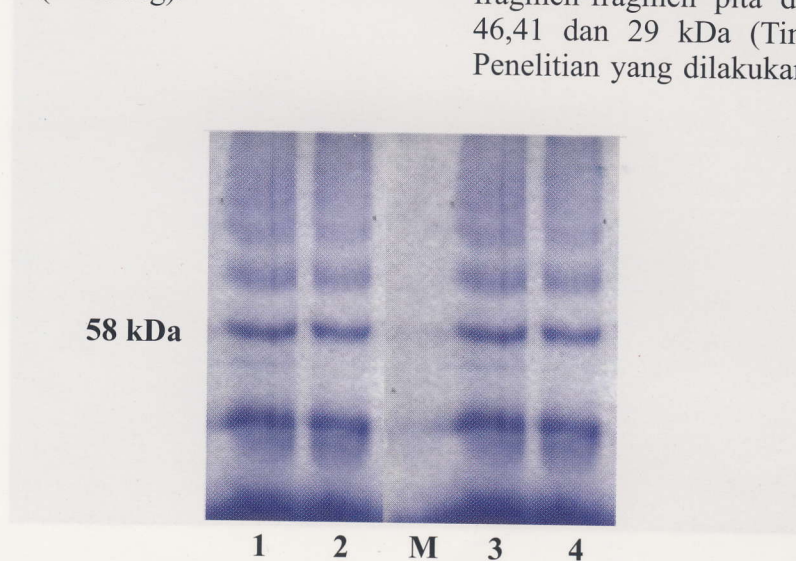
\* Tikus yang tidak diinjeksi (sebagai kontrol)

ekor tikus percobaan (*Rattus norvegicus*) dan 1 ekor tikus yang tidak diinfeksi digunakan sebagai kontrol. Lima hari setelah injeksi, sampel darah diambil melalui pleksus retroorbitalis. Sampel darah diinkubasi selama 30 menit pada 37°C, kemudian disentrifugasi dan serum yang diperoleh disimpan pada -20°C untuk dilakukan uji ELISA *antigen capture* dengan menggunakan antibodi monoklonal anti-MLP *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Prototipe diagnostik kit yang sudah cukup sensitif setelah melalui uji laboratoris digunakan untuk deteksi sampel serum kera yang diperoleh di lapangan. Sampel serum kera dikoleksi dari Pusat Studi Satwa Primata (Bogor) dan Biofarma (Bandung).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis protein M-like dengan menggunakan SDS-PAGE memperlihatkan pita major dengan berat molekul kira-kira 58 kDa (Gambar 1). Protein mirip M (MLP) *S. equi* subsp. *zooepidemicus* yang diisolasi dalam penelitian ini mempunyai berat molekul utama yang sama dengan M-protein *Streptococcus equi* strain CF32 (*reference strain*) hasil ekstrak mutanolysin yaitu kira-kira 58 kDa. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Timoney *et al.* (1995). M-protein *Streptococcus equi* strain CF32 hasil ekstrak mutanolysin mempunyai berat molekul kira-kira 58 kDa, dalam ekstrak asam tampak fragmen-fragmen pita dengan berat molekul 46,41 dan 29 kDa (Timoney *et al.*, 1995). Penelitian yang dilakukan oleh Timoney *et al.*



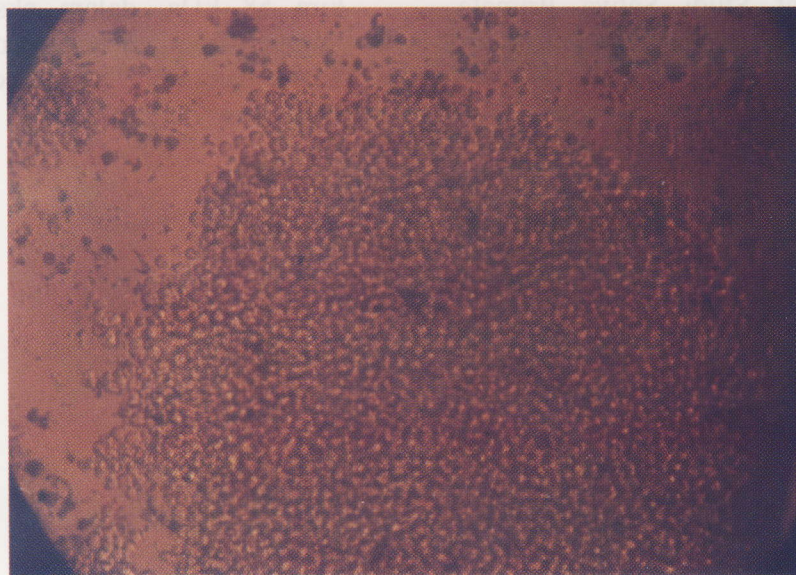
Gambar 1. Analisis M-like protein (MRP) *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolat kera (1-4) hasil ekstrak mutanolysin, dengan SDS-PAGE. M = marker.

(1995) selanjutnya pada *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolat kuda diketahui mempunyai protein protektif M-like yang diperoleh dalam ekstrak mutanolisin dengan berat molekul antara 50-60 kD.M-protein. Protein M telah terbukti sebagai faktor virulensi pada *Streptococcus* grup A (Manjula *et al.*, 1986). *Streptococcus zooepidemicus* (SGC) memiliki antigen spesifik yang dikenal dengan protein M seperti yang terdapat pada *Streptococcus* grup A. Antigen protein M pada *Streptococcus* grup A memiliki gen yang homolog dengan antigen protein M SGC. Protein M mempunyai sifat stabil terhadap panas dan asam, pada *streptococcus* diduga sebagai faktor virulen yang berperan untuk mengadakan perlekatan pada sel-sel epitel dan bersifat anti fagositik (Beachey *et al.*, 1988). Respon imun protektif M-protein ditunjukkan terutama pada aktivitasnya yang secara langsung menetralkan sifat antifagositik. Sifat antifagositik M-protein dapat dilihat dari kemampuannya mengikat fibrinogen dan mampu menurunkan deposisi C3 pada permukaan bakteri (Beachey *et al.*, 1988).

Hasil isolasi dan purifikasi MLP *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolat kera digunakan sebagai antigen yang digunakan untuk

imunisasi pada mencit Balb/c untuk menimbulkan antibodi dalam tubuh mencit. Perkembangan antibodi mencit dimonitor dengan uji ELISA. Dari 10 ekor mencit diperoleh 4 ekor yang mempunyai serum dengan absorbansi masing-masing 2,289, 2,868, 2,475 dan 2,833 pada pengenceran serum 3.200 kali. Mencit yang mengandung antibodi dengan absorbansi tertinggi (2,868) diambil limpanya untuk memperoleh limfosit imun (limfoblast). Sel mieloma yang digunakan untuk fusi dalam kondisi fase pertumbuhan logaritmik. Dari hasil fusi ini diperoleh 4 klon hibridoma yang positif mengandung antibodi terhadap MLP, dengan nilai absorbansi masing-masing 1,900, 1,963, 1,895 dan 2,050. Pertumbuhan klon hibridoma yang homogen dapat dilihat pada Gambar 2. Dari sekitar 100 hibridoma diperoleh 4 klon (4%) yang menghasilkan antibodi anti MLP. Peters dan Baumgarten (1992), melaporkan bahwa dari sekitar 600 produk fusi hanya 1 sampai 3 klon yang tumbuh (0,05%).

Propagasi 4 klon penghasil antibodi dilakukan dalam pelat mikro 96 dengan 24 sumur. Kloning, rekloning dan uji ELISA dilakukan secara terus menerus untuk mempertahankan klon yang baik. Kloning

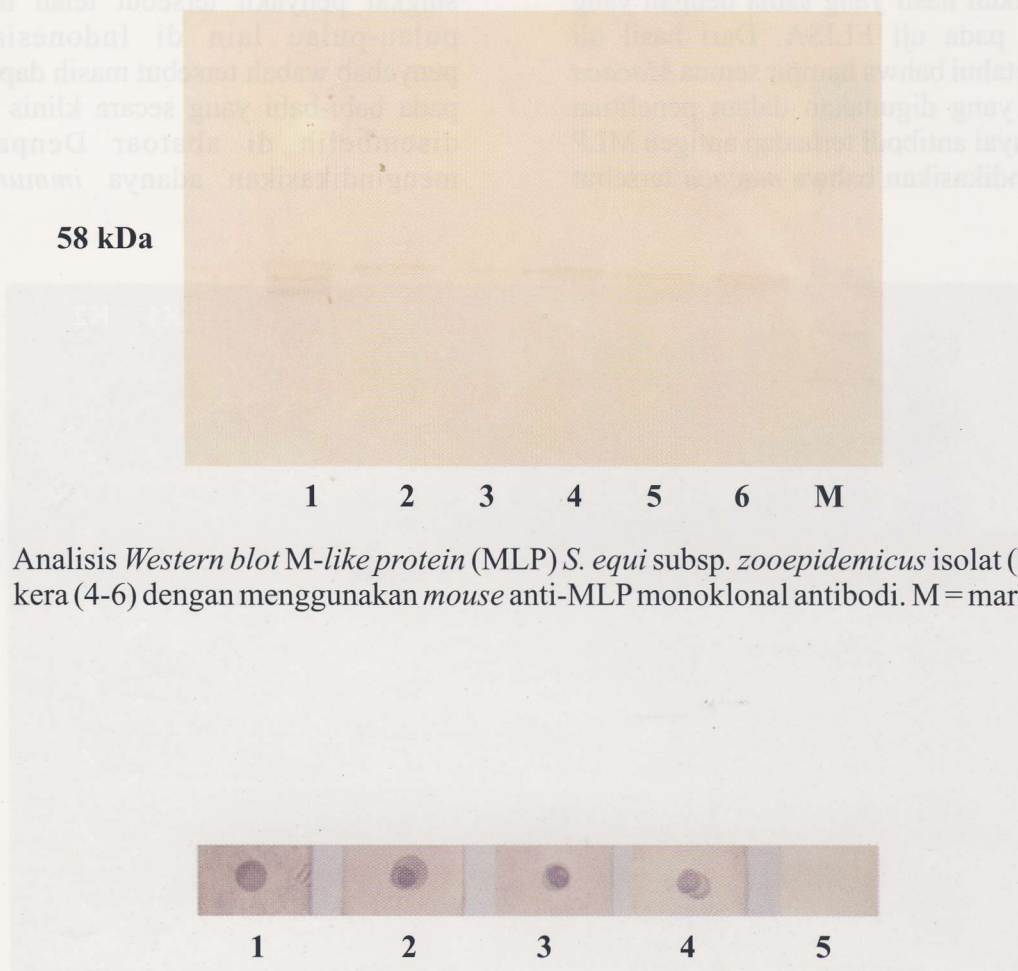


Gambar 2. Kultur hibridoma terpilih yang menghasilkan antibodi monoklonal anti MLP, tampak tumbuh lebih banyak.

dilakukan untuk mengisolasi satu sel yang mensekresi antibodi spesifik sehingga diperoleh *monoclonal cell line*. Perbanyakkan antibodi monoklonal secara *in vivo* dengan cara memproduksi cairan asites mencit setelah injeksi hibridoma secara intraperitoneal. Sebelum injeksi dengan  $5 \times 10^6$  sel/mL hibridoma, mencit disuntik dengan *pristane* untuk menekan imun normal (Liddle dan Cryer, 1991). Hasil uji ELISA cairan asites diperoleh titer (nilai absorban) 3,208 (pada pengenceran 100x), 3,610 (200x), 3,012 (400x) dan 2,201 (800x).

Hasil analisis *western blot* MLP *S. equi*

subsp. *zooepidemicus* isolat kera dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil analisis tersebut memperlihatkan bahwa monoklonal antibodi terhadap MLP dapat mengenal pita protein pada berat molekul sekitar 58 kDa. Protein spesifik MLP yang telah diimunisasikan ke mencit Balb/c ternyata mampu menimbulkan respon imun pada mencit, sehingga dapat menghasilkan antibodi monoklonal yang mempunyai afinitas spesifik yang sangat tinggi terhadap antigen MLP. Reaksi ini dapat pula dilihat pada uji *dot-blot* yang memperlihatkan intensitas kuat pada spot hasil *dot-blot*. Reaksi spesifik antara antibodi monoklonal dengan



Gambar 3. Analisis *Western blot* M-like protein (MLP) *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolat (babi, 1-3) dan kera (4-6) dengan menggunakan *mouse* anti-MLP monoklonal antibodi. M = marker.

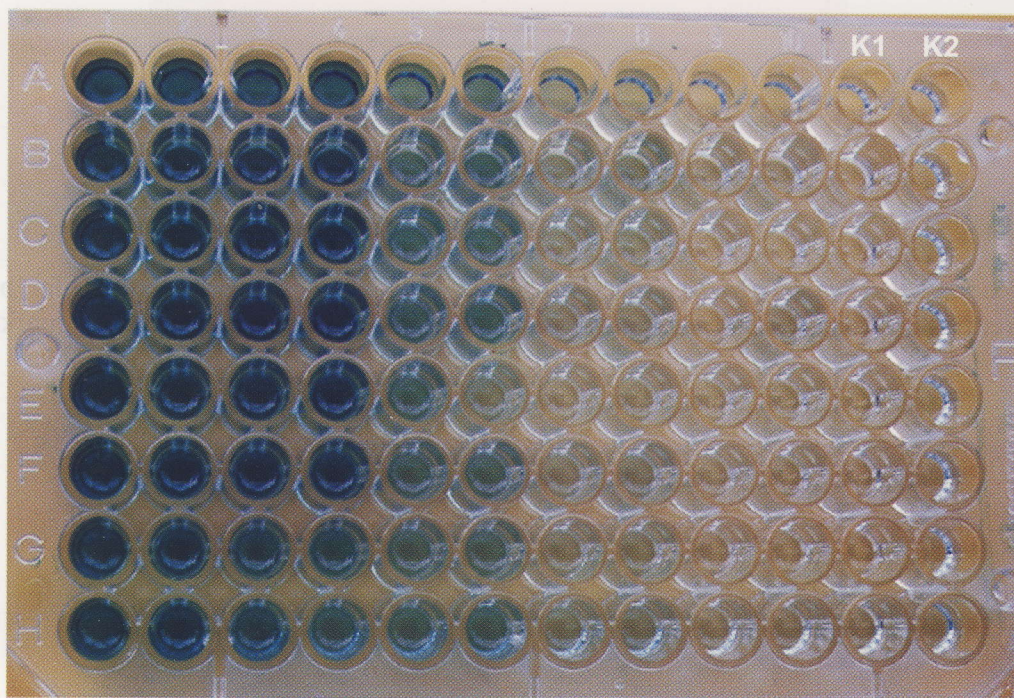
Gambar 4. Hasil reaksi *dot blot* antigen M-like protein (MLP) *S. equi* subsp. *zooepidemicus* dengan menggunakan antiserum tikus percobaan (1-4) yang diinfeksi secara buatan dengan *S. equi* subsp. *zooepidemicus*; Kontrol negatif (serum tikus sehat, 5).

antigen MLP ini disebabkan karena antibodi dapat mengenal satu epitop spesifik (Peters dan Baumgartner, 1992).

Hasil uji ELISA dan *dot-blot* serum tikus percobaan yang diinjeksi dengan larutan kultur *S. equi* subsp. *zooepidemicus* dapat dilihat pada Tabel 1 dan hasil reaksi *dot-blot* dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil uji ELISA sampel serum lapangan *Macaca fascicularis* dapat dilihat pada Gambar 5.

Hasil uji ELISA sebanyak 41 sampel serum *Macaca fascicularis* memperlihatkan bahwa sebanyak 40 sampel (97,56%) bereaksi positif. Sebagian sampel tersebut juga telah diuji dengan menggunakan *dot-blot* yang memperlihatkan hasil yang sama dengan yang ditunjukkan pada uji ELISA. Dari hasil uji tersebut diketahui bahwa hampir semua *Macaca fascicularis* yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai antibodi terhadap antigen MLP yang mengindikasikan bahwa *macaca* tersebut

kemungkinan pernah diinfeksi oleh *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pernah diisolasi dari kera yang mati pada saat terjadi wabah pada tahun 1994 di hutan wisata alam Bali (Salasia, 1996). Wabah streptokokosis pada tahun tersebut menyebabkan kematian ratusan kera yang dilindungi dikawasan wisata di wilayah Bali. Kematian pada kera dianalisis akibat terinfeksi oleh kuman yang sama yang mengakibatkan kematian pada ribuan babi di Bali dengan gejala umum kepincangan, nafas ngorok dan gangguan koordinasi yang secara patologis ditandai dengan artritis, pneumonia dan meningitis (Dharma *et al.*, 1994). Dalam waktu singkat penyakit tersebut telah menjalar ke pulau-pulau lain di Indonesia. Kuman penyebab wabah tersebut masih dapat dijumpai pada babi-babi yang secara klinis sehat yang disembelih di abatoar Denpasar Bali, mengindikasikan adanya *immune carrier*



Gambar 5. Hasil uji ELISA sampel serum *Macaca fascicularis* lapangan (B-H), kontrol positif serum tikus percobaan yang diinfeksi *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (A), kontrol negatif (K1-2)



(Salasia, 1998; Salasia *et al.*, 2002). Infeksi *Streptococcus* grup C mempunyai potensi zoonotik, karena SGC tersebut telah berhasil diisolasi pada pemandu wisata di kawasan Hutan Wisata Alam Bali (Salasia *et al.*, 2002) dan dapat beradesi pada sel-sel epitel bukalis pada manusia maupun kera (Himawan dan Salasia, 2001). Adanya antibodi positif terhadap MLP *S. equi* subsp. *zooepidemicus* pada *Macaca fascicularis* yang diuji dalam penelitian ini kemungkinan infeksi *S. equi* subsp. *zooepidemicus* sejak tahun 1994 telah menyebar ke berbagai wilayah di Indonesia dan

*macaca* pada berbagai wilayah, sehingga *macaca* tersebut kemungkinan telah mengalami *immune carrier*.

Dengan terbukti adanya antibodi yang terdeteksi pada serum *macaca* yang diisolasi di lapangan menunjukkan bahwa *macaca* tersebut pernah diinfeksi *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, hewan-hewan tersebut dalam kondisi yang tidak baik bisa menimbulkan reinfeksi dan hewan *immune carrier* ini dapat menularkan ke hewan-hewan sehat maupun manusia disekitarnya. Untuk mengatasi hal tersebut perlu dikembangkan pencegahan infeksi ini baik pada satwa primata maupun pada manusia dengan pengembangan vaksin berdasarkan antigen virulen MLP yang telah dikembangkan dalam penelitian ini.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan dukungan dana Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Penelitian Hibah Bersaing IX. Ucapan terimakasih disampaikan kepada drh. Joko Pamungkas, M.Sc., kepala Pusat Studi Satwa Primata, Bogor dan drh. Agus Wahyu Widayanto, Biofarma, Bandung, atas budi baiknya dalam memberikan sampel serum *macaca*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Beachey, E.H., Giampapa, C.S. and Abraham, S.N. 1988. Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 45-48.
- Himawan dan Salasia, S.I.O. 2001. Adesi *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pada sel epitel bukalis kera dan manusia. *Media Kedokteran Hewan*, 17(2): 79-82.
- Liddle, J.E., and Cryer, A. 1991. *A practical guide to monoclonal antibodies*. John Willey & Sons. New York, Singapore.
- Manjula, B.N. and Fischetti, V.A. 1986. Sequence homologie of group A streptococcal Pep M5 protein with other coiled-coil proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140, 684-690.
- Peters, J.H., Baumgarten, H., Hahn, G. and Bartelheimer, E.W. 1985. *Monoklonale Antikörper Herstellung und Charakterisierung*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Peters, J.H. and Baumgarten, H. 1992. Culture and enrichment of hybridoma clones to be expected. *In: Monoclonal Antibodies*. Peters, J.H. and Baumgarten (eds.). Springer-Verlag. Berlin, 192-194.
- Salasia, S.I.O. 1994. *Untersuhungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von Streptococcus suis*. Vet.Med.Diss. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Salasia, S.I.O. 1996. *Karakterisasi Streptococcus zooepidemicus pada babi dan kera di Bali*. Laporan Proyek Penelitian DPP-UGM.

- Salasia, S.I.O. 1998. *Comparison of phenotype and genotype expression of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus isolated from clinical and subclinical cases of swine in Indonesia*. Post Doctoral Research Report, JLU-Giessen, Germany.
- Salasia, S.I.O. 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies for detection of virulent factors of *Streptococcus suis*. *Indon. J. Biotech.* 464-469.
- Salasia, S.I.O., B. D. Haryanto, IGK Suarjana, A. Purwantoro dan M. Haryadi. 2002. Potensi zoonotik *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*: Karakterisasi isolat asal manusia, kera dan babi di Bali. *J. Sain. Vet.* (1): 48-53.
- Salasia, S.I.O. 2002. Determination of intraspecies variations of the V2 region of the 16S rRNA gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from pigs, monkeys and human on the island of Bali, Indonesia. *Indon. J. Biotech.* 513-521.
- Sajuthi, D. 1998. *Pengelolaan kesehatan satwa liar dalam upaya meningkatkan mutu satwa liar Indonesia dalam era ekolabelling dan ekowisata: Satwa primata sebagai model*. Seminar sehari: "Konservasi satwa liar dalam upaya menjaga keseimbangan ekosistem dan meningkatkan kesejahteraan manusia di era perdagangan bebas". UGM Yogyakarta, 23 Mei.
- Soedarmanto, I., Pasaribu, F.H., Wibawan, I.W.T. and Lämmler, C. 1996. Identification and molecular characterization of serological group C Streptococci isolat from diseased pigs and monkeys in Indonesia. *Clin. Mikrobiol.* 34: 2201-2204.
- Timoney, J.F., Walker, J., Zhou, M. and Ding, J. 1995. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infect. Immun.* 63, 1440-1445.
- Timoney, J.F., Umbach, A., Boschwitz, J.E. and Walker, J.A. 1994. *Streptococcus equi subsp. equi* express 2 M-like proteins including a homologue of variable M-like protective protein of subsp. *zooepidemicus*. Equine infectious disease VII. Proceeding of the Seventh International Conference, Tokyo, 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> June.