

REKONSTITUSI ISOLAT KERING BEKU BAKTERI *Pasteurella multocida* PENYEBAB PENYAKIT NGOROK PADA SAPI DAN IDENTIFIKASI ULANG SECARA KONVENSIONAL DAN MOLEKULER

Sri Suryatmiati Prihandani*

Kelti Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner

*Korespondensi email: sri2suryatmiati@gmail.com

Abstrak. Daging sapi sebagai salah satu sumber protein hewani sangat digemari masyarakat luas karena dapat diolah menjadi beragam menu dan memiliki citarasa nikmat. Ketersediaan daging sapi sebagai bahan pangan asal hewan dipengaruhi oleh kondisi kesehatan dalam pemeliharaannya. Pada musim pancaroba, beberapa penyakit endemis seperti penyakit Ngorok (*Septicaemia epizootica*) yang disebabkan oleh bakteri *Pasteurella multocida* dapat menyebabkan gangguan produksi. Oleh karena itu perlu diketahui bagaimana morfologi dan sifat bakteri tersebut. Pada penelitian ini dilakukan rekonstitusi isolat kering beku bakteri *P. multocida* asal sapi dan identifikasi ulang secara konvensional dan molekuler untuk mengetahui karakteristiknya. Setelah direkonstitusi pada media *Brain Heart Infusion*, subkultur pada media agar darah, identifikasi dilakukan secara biokimia dan molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction*. Hasilnya secara morfologi teridentifikasi isolat *P. multocida* memiliki bentuk morfologi batang pendek (kokoid) dan pewarnaan Gram negatif, tidak tumbuh dalam medium agar *Mac Concey*, non motil, oksidase positif, dan katalase positif. Uji fermentasi karbohidrat pada media *Triple Sugar Iron Agar* menunjukkan bahwa isolat *P. multocida* dapat memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa tetapi tidak menghasilkan gas H₂S dan CO₂. Amplifikasi terhadap gen spesifik *P. multocida* dilakukan menggunakan primer standar OIE yang memberikan produk PCR sepanjang 460 bp sesuai dengan standar OIE. Kesimpulan dari penelitian ini memberikan informasi bahwa rekonstitusi isolat kering beku *P. multocida* secara konvensional dan molekuler menunjukkan bakteri yang identik dengan aslinya. Selanjutnya diharapkan kerugian ekonomi tinggi akibat penyakit ngorok pada sapi dapat diantisipasi dengan pendeteksian agen penyakit sedini mungkin.

Kata kunci: rekonstitusi, kering beku, konvensional, molekuler, *Pasteurella multocida*

Abstract. Beef as a source of animal protein is very popular because it can be processed into various menus and has a delicious taste. The availability of beef as a food ingredient of animal origin is influenced by health conditions in its maintenance. During the transition season, several endemic diseases such as Snoring disease (*Septicemia epizootica*) caused by *Pasteurella multocida* can cause production disruptions. Therefore it is necessary to know how the morphology and properties of this bacteria. In this study, the reconstitution of freeze-dried *P. multocida* isolates from cows continued with conventional and molecular re-identification were carried out to determine their characteristics. After reconstituting on *Brain Heart Infusion* media, subculturing on blood agar media, identification was carried out with biochemically step and molecularly step with the *Polymerase Chain Reaction* technique. The results showed that *P. multocida* isolates had morphologically short stems (coccoid) and Gram negative staining, did not grow in *Mac Concey* agar medium, non motile, oxidase positive, and catalase positive. The carbohydrate fermentation test on *Triple Sugar Iron Agar* media showed that *P. multocida* isolates could ferment glucose, lactose and sucrose but did not produce H₂S and CO₂ gas. Amplification of specific *P. multocida* genes was carried out using OIE standard primers which gave a PCR product of 460 bp in accordance with OIE standards. The conclusions of this study provide information that the conventional and molecular reconstitution of *P. multocida* freeze-dried isolates shows that bacteria are identical to the original. Furthermore, it is expected that high economic losses due to snoring in cattle can be anticipated by detecting the disease agent as early as possible.

Keywords: reconstitution, freeze dried, conventional, molecular, *Pasteurella multocida*

PENDAHULUAN

Pasteurella multocida pertama kali diisolasi oleh Toussaint pada tahun 1870 dan pada tahun 1881, Louis Pasteur melakukan penelitian yang lebih komprehensif dari kasus *fowl cholera* pada ayam. *Pasteurella multocida* adalah bakteri Gram-negatif patogen yang telah diklasifikasikan menjadi tiga subspecies (subspecies *multocida*, *septica* and *gallicida*), lima serogrup berdasarkan antigen kapsularnya A, B, D, E dan F (Carter, 1967; Rimler and Rhoades, 1987; Harper et al, 2012) dan 16 serovar berdasarkan antigen somatiknya (1-16). Pengelompokan *P. multocida* menjadi lima serogrup (A, B, D, E dan F) berdasarkan polisakarida yang diekspresikan oleh kapsulnya menggunakan teknik *indirect hemagglutination test* (Carter, 1952), sedangkan 16 serovar somatik atau lipopolisakarida (LPS) atau populer disebut 16 serotipe menggunakan teknik *Heddleston gel diffusion precipitin test* (Heddleston et al., 1972). *P. multocida* dengan jenis kapsul berbeda akan menyebabkan penyakit yang berbeda, misalnya serogrup B dan E akan menyebabkan septikemi hemoragik pada sapi dan kerbau, serogrup D menyebabkan atrofi rhinitis pada babi dan serogrup A menyebabkan kolera pada unggas (Boyce and Adler, 2000) namun serogrup A juga merupakan mikroorganisme komensal oportunistik pada sapi (Dabo, 2007). *P. multocida* juga dikaitkan dengan kejadian septikemia pada kelinci, babi, septikemia dan pneumonia pada sapi (Wilkie et al., 2012; Liu et al., 2017).

Studi terhadap bakteri *P. multocida* di BB Litvet terus berlanjut dengan tujuan pengembangan deteksi dan pembuatan vaksinnya. Untuk menjaga kelestarian bakteri, maka isolat *P. multocida* yang telah didapatkan dari hasil isolasi dari lapangan disimpan dalam bentuk kering beku di BB Litvet *Culture Collection*.

Pada penelitian ini digunakan isolat *P. multocida* koleksi BB Litvet *Cultur Collection* (BCC) dalam awetan ampul liofilisasi. Isolat diaktifkan kemudian dilakukan uji viabilitas, kemurnian dan identifikasi ulang secara pewarnaan Gram dan beberapa uji biokimia, kemudian dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan teknik PCR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk merekonstitusi isolat *P. multocida* berbentuk kering beku yang akan ditumbuhkan pada medium *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian dilakukan serangkaian identifikasi ulang baik secara konvensional dan molekuler. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Kelompok Penelitian Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

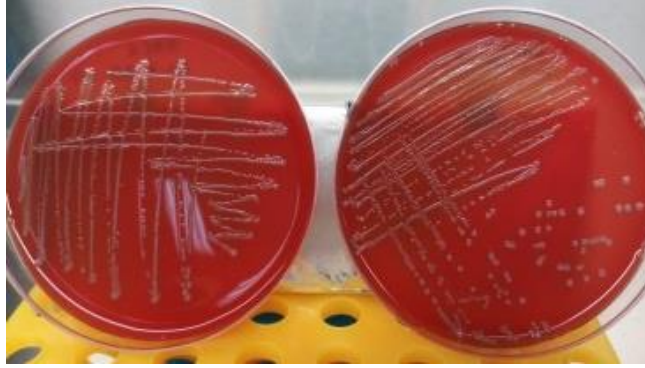
Isolat dalam awetan ampul keringbeku diaktifkan dengan cara memotong leher kaca ampul memakai alat potong gelas, kemudian 0,5 ml medium kaldu Brain Hart infusio (BHI) dimasukkan ke dalam ampul isi isolat. isi ampul kemudian diinokulasikan ke dalam medium kaldu BHI dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam. Untuk mengetahui kemurnian bakteri tersebut, kultur dipindahbiakkan dengan cara menginokulasikan satu ose kultur pada medium agar 5% darah domba, kemudian diinkubasikan pada

suhu 37°C selama satu malam. Koloni yang tumbuh diidentifikasi menurut prosedur yang ditetapkan oleh Carter (1963) dan Cowan (1974).

Reidentifikasi Isolat *P. multocida* dari rekonstitusi dilakukan dengan menentukan morfologi sel, morfologi koloni, uji biokimia pada media TSIA, uji oksidase, uji katalase. Pemeriksaan Molekuler diawali dengan ekstraksi DNA bakteri menggunakan Qiagen® kit. Selanjutnya dilakukan PCR menggunakan KAPA Taq ReadyMix PCR Kit, primer forward, primer reverse, TBE 1X (Tris Base 89 mM, boric acid 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0), agarose (Sigma), Fluorosafe dan marker 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific™), microfuge tube, nuclease free water (Invitrogen™). Primer yang digunakan untuk identifikasi ulang adalah primer 16S rRNA dan primer gen spesifik (*kmt*). Primer untuk amplifikasi gen 16S rRNA (16S PM1) dirancang menggunakan 5 referensi gen 16S rRNA *p. multocida* yang terdapat pada GenBank digunakan konstruksi pada perangkat online Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>) dengan urutan basa nukleotida primer forward: 5'-AGG-CCT-TCG-GGT-TGT-AAA-GT-3 dan reverse: 5'-CCA-TGC-AGC-ACC-TGT-CTC-TA3' yang akan menghasilkan ukuran produk PCR sepanjang 642 bp (Prihandani *et al.*, 2017). Amplifikasi gen *kmt* yang merupakan Gen spesifik berukuran 460 bp yaitu KMT1T7: 5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3' dan KMT1SP6: 5'-GCTGTAAACGAACTCGCCAC-3' (Townsend *et al.*, 2001). Reaction mix dimasukkan ke tube PCR, yang terdiri atas 12,5 ul KAPA Taq ReadyMix PCR Kit, primer forward 0,5 ul dan primer reverse 0,5 ul dengan konsentrasi masing-masing 20 pmol, 4,5 ul nuclease free water dan 2 ul template DNA. Volume akhir yang didapat adalah 20 ul. Thermocycler diprogram untuk *pre denaturation* (suhu 94°C selama 2 menit); denaturasi (suhu 94°C selama 20 detik); *annealing* (suhu 51°C selama 20 detik); *elongation* (suhu 72°C selama 1 menit); *post elongation* (suhu 72°C selama 5 menit). Reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1,5% yang dijalankan pada tegangan 120 volt, 200 Ampere selama 30 menit. Analisis produk PCR berupa pita DNA diamati dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 260$ nm) dan didokumentasi, kemudian panjang fragmen diketahui dengan membandingkan setiap fragmen dengan marker DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil rekonstitusi isolat kering beku setelah ditumbuhkan kembali pada media agar darah 5% menunjukkan bahwa isolat *P. multocida* yang disimpan dalam bentuk keringbeku dapat tumbuh (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Rekonstitusi isolat *P. multocida* pada media agar darah 5%

Salah satu metode penyimpanan mikroba adalah *freeze drying* (liofilisasi) (Badjoeri, 2010). Proses utama metode *freeze drying* adalah pengeringan secara sublimasi. Pada metode penyimpanan ini, sampel melalui proses pembekuan dan pengeringan. Tujuan dilakukan preservasi adalah untuk menahan laju aktivitas metabolisme mikroba sehingga viabilitas atau daya tumbuhnya dapat dipertahankan dan juga untuk memelihara isolat mikroba sehingga mempunyai *recovery* (daya tumbuh kembali) dan kelangsungan hidup yang tinggi dengan perubahan karakter yang minimum. Mikroba yang telah disimpan menggunakan cara *freeze drying* diharapkan dapat tumbuh kembali. Hasil rekonstitusi isolat *P. multocida* menunjukkan bahwa isolat tersebut viabel dan murni (Gambar 1).

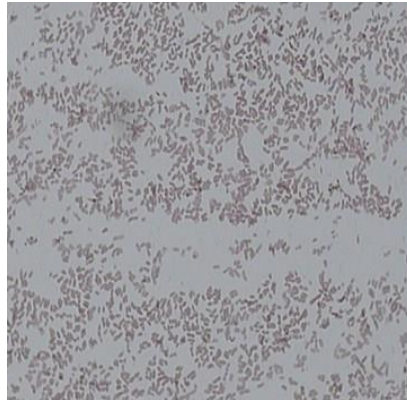
Reidentifikasi Isolat *Pasteurella multocida* menunjukkan hasil sebagaimana berikut:

Morfologi

Pemeriksaan mikrobiologi terhadap isolat bakteri hasil rekonstitusi (Gambar 1) menunjukkan bakteri dapat tumbuh pada media agar darah, konveks dan non hemolitik. Pengamatan fenotipe *P. multocida* secara mikroskopis dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram. Salah satu cara identifikasi mikroba adalah dengan menentukan morfologinya baik morfologi sel maupun morfologi koloninya. Hasil pengamatan morfologi sel *P. multocida* menggunakan pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *P. multocida* secara mikroskopis terlihat berbentuk kokobasilus, bipolar, berkoloni berdua-dua atau lebih, Gram negatif (Gambar 2).

Pewarnaan Gram isolat bakteri kering beku menunjukkan menyerap warna merah (safranin). Hal ini memberikan informasi bahwa isolat yang direkonstitusi merupakan Gram negatif. Bakteri Gram negatif dibedakan dari bakteri Gram positif dari struktur dinding selnya. Dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tebal, sedangkan Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tebal. Ketika ditambahkan pewarnaan kristal violet maka dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif akan menyerap zat warna tersebut namun ketika diberi alkohol, kristal violet pada Gram negatif akan luntur disebabkan struktur dinding selnya yang sebagian besar tersusun oleh lipid, sehingga ketika diberi safranin (zat warna kedua) dinding sel bakteri gram negatif akan menyerapnya kembali sehingga

hasil pewarnaan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Horne *et al.* 2020, Beveridge, 1999). Pewarnaan Gram akan berhasil baik apabila biakan segar yang digunakan berumur 24-48 jam, karena pada biakan tua mengalami banyak kerusakan pada bagian dinding selnya, hal ini menyebabkan zat warna keluar saat pencucian dengan larutan pemucat, sehingga akan menyamarkan hasil (Mahmudah *et al.*, 2016).



Gambar 2. Pengamatan Pewarnaan Gram *P. multocida* (Perbesaran 100X)

Uji Biokimia

Hasil reidentifikasi dengan uji biokimia, menunjukkan isolat kering beku koleksi BCC tumbuh dan tidak membentuk zona hemolisis dalam medium agar darah, tidak tumbuh dalam media agar *Mac Conkey*, non motil, oksidase positif, dan katalase positif. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan bersama dengan uji pembentukan H₂S pada media TSIA (triple sugar iron agar). Hasil yang didapatkan menunjukkan media TSIA yang ditusuk dengan isolat kering beku mengalami perubahan warna dari merah menjadi kuning pada bagian dasar (*butt*) dan bagian miring (*slant*), tidak terbentuk gas, tidak terbentuk H₂S, uji oksidase, indol dan reduktase nitrat positif, urease negatif, memfermentasi glukosa dan sukrosa tetapi tidak memfermentasi laktosa dan maltose, serta tidak tumbuh pada media agar *Mac Conkey* (de Alwis *et al.*, 1980).

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya enzim sitokrom oksidase pada bakteri dengan menggunakan paper oksidase yang dapat menunjukkan perubahan warna yang terjadi pada paper oksidase saat digores dengan koloni bakteri menggunakan ose menjadi ungu kebiruan dalam waktu sekitar 1-2 menit. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan bersamaan dengan uji pembentukan H₂S pada media TSIA (triple sugar iron agar). Hasil yang didapatkan menunjukkan media TSIA yang ditusuk dengan isolat kering beku mengalami perubahan warna dari merah menjadi kuning pada bagian dasar (*butt*) dan bagian miring (*slant*). Sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat ini dapat memfermentasikan glukosa, laktosa dan sukrosa. Isolat tidak menghasilkan gas H₂S dan CO₂ sebagai sisa proses fermentasi. Salah satu cara untuk menyeleksi bakteri adalah dengan menumbuhkannya pada media selektif, contohnya media *Mac*

Conkey Agar plate (MCA). MCA adalah media yang mengandung zat inhibitor garam empedu (*bile salt*) yang berfungsi untuk menekan pertumbuhan bakteri Gram positif tetapi menumbuhkan Gram negatif kecuali *Pasteurella* dan *Haemophilus*. Isolat kering beku yang direkonstitusi tidak tumbuh pada media agar *Mac Conkey* menunjukkan bahwa isolat tersebut terkonfirmasi merupakan *Pasteurella*.

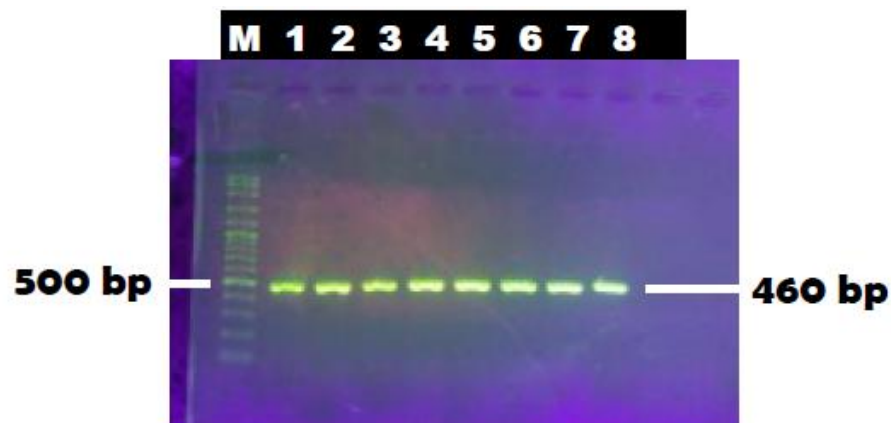
Pemeriksaan Molekuler

Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR

Identifikasi molekuler pertama dilakukan menggunakan sepasang primer 16S PM1 yang memberikan hasil tampilan produk PCR sepanjang 642 bp setelah dielektroforesis pada gel agarose.

Amplifikasi gen (kmt) spesifik P. multocida dengan PCR

Identifikasi spesies *P. multocida* dilakukan dengan mendeteksi keberadaan gen spesifik (*kmt*). DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi dengan metode PCR mengikuti Sambrook and Russell (2001). Amplifikasi terhadap gen spesifik *P. multocida* dilakukan menggunakan primer standar OIE yang memberikan produk PCR sepanjang 460 bp saat dielektroforesis pada gel agarose. Amplifikasi isolat kering beku yang direkonstitusi dalam penelitian ini tampak pada Gambar 3 dan memenuhi kriteria identifikasi sebagai *P. multocida*.



Gambar 3. Amplifikasi gen (*kmt*) *P. multocida*

Penyakit ngorok akibat *P. multocida* diakui sebagai penyakit penting yang dapat mempengaruhi perekonomian, sedangkan konfirmasi isolat sulit ditentukan karena beberapa gejala klinis dan prosedur laboratorium yang memakan waktu lama (Varte *et al.*, 2014). Deteksi *P. multocida* dapat dipercepat menggunakan teknik molekuler dengan beberapa pertimbangan keunggulannya jika dibandingkan dengan uji biokimia, antara lain cepat, sensitif, spesifik, dan tidak rumit (Abbas *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil penelitian, penggunaan teknik molekuler sangat berguna untuk mengklasifikasikan *P. multocida* yang belum diklasifikasikan (Narcana *et al.*, 2020). Teknik molekuler dapat mengidentifikasi serotipe isolat *P. multocida* secara lebih cepat dan akurat. Selain cepat dan handal, teknik PCR merupakan metode yang dapat digunakan untuk karakterisasi bakteri. Penggunaan gen 16S

rRNA sebagai target untuk mengklasifikasikan dan mengkarakterisasi bakteri telah umum dilakukan (Suardana, 2014). Penggunaan primer spesifik KTT 72 dan KTSP61 untuk mengklasifikasikan serotipe *P. multocida* telah berhasil juga digunakan peneliti lain untuk mengidentifikasi *P. multocida* tipe B: 2, B: 5, dan B: 2,5 (Townsend *et al.*, 1998).

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini memberikan informasi bahwa rekonstitusi isolat kering beku *P. multocida* secara konvensional dan molekuler menunjukkan bakteri yang identik dengan aslinya, dimana karakteristik yang ditunjukkan dari hasil uji biokimia dan deteksi dengan teknik PCR sesuai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner, Ketua BB Litvet *Culture Collection*, Ketua Kelti Bakteriologi, Dr. drh. Susan M. Noor, MVSc yang telah memfasilitasi penelitian ini, drh. Rini Damayanti., MSc selaku kolega senior dan Bapak Safarudin yang telah mendukung kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.M, Abd El-Moaty D.A.M, Zaki E.S.A, El-Sergany E.F, El-Sebay N.A, Fadl H.A, Samy A.A. 2018. Use of molecular biology tools for rapid identification and characterization of *Pasteurella* spp. *Veterinary World*, 11(7):1006–1014.
- Badjoeri M. 2010. Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutfah. *Warta Limnologi Tahun XXIII No. 45*: 1-9.
- Beveridge T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Boyce JD, and Adler B. 2000. The Capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M-1404 (B-2). *Infection Immunity*, 68(6): 3463-3468.
- Carter GR. 1952. The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida*. *Canadian Journal of Medical Science*, 30(1):48-53.
- Carter GR. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Advances in Veterinary Science*, 11:321–379.
- Carter, G.R. and D.E. Rappay. 1963. A haemagglutination test employing specific lipopolysaccharide for the detection and measurement of *Pasteurella multocida* antibodies to *Pasteurella multocida*. *British Veterinary Journal*. 119: 73-77.
- Cowan. 1981. Manual for the identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Cambridge University press. London.
- Dabo, S.M., J.D. Taylor, and A.W. Confer. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8(2): 129-150.
- de Alwis, M. C., Carter, G. R., & Chengappa, M. M. 1980. Production and characterization of streptomycin dependent mutants of *Pasteurella multocida* from bovine haemorrhagic septicaemia. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*, 44(4), 418–422.

- Harper M, Boyce JD, Adler B. 2012. Review The key Surface Components of *Pasteurella multocida*: Capsule and Lipopolysaccharide. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 361:39-51.
- Heddleston, K.L., J.E. Gallagher and P.A. Rebers. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Diseases*, 16: 925-936.
- Horne, J. E., Brockwell, D. J., & Radford, S. E. 2020. Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 295(30), 10340–10367.
- Liu H, Zhao Z, Xi X, Xue Q, Long T, Xue Y. 2017. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015. *Irish Veterinary Journal*, 70: 2.
- OIE (Office International des Epizooties). 2008. *Haemorrhagic Septicaemia*, Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals 21.
- Rimler, R. B., & Rhoades, K. R. 1987. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *Journal of clinical microbiology*, 25(4), 615–618.
- Sambrook J, and Russel DW. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3th edition. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Suardana I.W. 2020. Analysis of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of novel *Escherichia coli* strains isolated from feces of human and Bali cattle. *Journal of Nucleic Acids*. Article ID 475754.
- Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4):1096-100.
- Varte Z, Dutta T.K, Roychoudhury P, Begum J, Chandra R. 2014. Isolation, identification, characterization and antibiogram of *Pasturella multocida* isolated from pigs in Mizoram with special reference to progressive atrophic rhinitis. *Veterinary World*, 7(2), 95–99.
- Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D., Adler B. 2012. *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. In: Aktories K., Orth J., Adler B. (eds) *Pasteurella multocida*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 361 :1-22.