

Uji Patogenitas *Pasteurella multocida* Isolat Lokal Pada Mencit

Herliani¹⁾, dan Abrani Sulaimani¹⁾

¹⁾Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru
Jalan A Yani Km 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan, KodePos
Telepon : 081251781010; 082149746633; 082155721122
Email: Herli4ni63@gmail.com; asulaima@yahoo.com

Abstrak

Penyakit *Septicemia Epizootica* atau yang populer dengan istilah ngorok merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Pasteurella multocida*. Penyakit ini dapat menimbulkan kerugian ekonomi. Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang diisolasi dari kerbau rawa di daerah Bararawa (Hulu Sungai Utara). Kultur tersebut diaktifkan dengan medium cair *brain heart infusion broth* (BHI). Selanjutnya dipindah biakkan pada media agar darah domba 5% daB BHI + 5% *foetal calf* serum (FCS). Setelah reidentifikasi bakteri tersebut diuji patogenitasnya pada mencit. Hasil pengamatan *P. multocida* tersebut masih dapat mematikan mencit dalam waktu 1 x 24 jam. Organ/cairan yang diamati adalah limpa, paru-paru, dan jantung dengan waktu yang berbeda yaitu kematian 15 jam, 35 jam, dan 59 jam. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sampel yang diisolasi dari paru, limpa, dan jantung mencit yang mati tersebut positif disebabkan oleh bakteri *Pasteurella multocida*. Dengan ciri-ciri koloni berbentuk bulat dengan permukaan cembung, berbentuk coccobacillus, bersifat Gram Negatif, dan berantai pendek. Isolat bakteri dipakai sebagai kandidat vaksin pada penelitian berikutnya.

Kata kunci: Pasteurella multocida, Isolat lokal, patogenitas, kandidat vaksin

I. PENDAHULUAN

Salah satu kendala yang sering ditemukan dalam peternakan adalah terjangkitnya penyakit menular pada ternak, salah satu diantaranya adalah penyakit menular pasteurellosis yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Pasteurella multocida*. Penyakit ini juga dikenal dengan nama *Hemoragik septicaemia*, *Atrophic rhinitis*, *Pneumonic pasteurellosis*, dan *Shipping, fever pneunzonia*.

Ternak yang terserang atau hewan penderita merupakan sumber infeksi utama untuk ternak di sekitarnya. Selain itu, pasteurellosis dapat berjangkit dari infeksi laten pada ternak - ternak yang mengalami stres. Faktor stres selain karena adanya perubahan cuaca dan kesalahan manajemen, juga sering berkaitan erat dengan stres akibat perjalanan jarak jauh dari daerah asal ternak ke rumah potong hewan. Pengendalian terhadap penyakit ini dapat dilakukan dengan cara vaksinasi. Beberapa tipe vaksin telah dipakai, namun kemampuan untuk melindungi terbatas hanya dalam beberapa minggu sejak vaksin pertama dijelaskan oleh Brain dan Jones (1965), Seleim (1993), Esslinger *et al.*, (1994) dan Seleim (1997). Penelitian tentang vaksin terus dilakukan tetapi belum ada vaksin yang lama bertahan pemakaiannya. Hal ini mungkin disebabkan vaksin yang diberikan tidak bersifat protektif, yaitu karena adanya perbedaan sifat antigenic antara isolat yang dipakai dengan isolate di lapangan (yang menginfeksi ternak).

Tahapan-tahapan sebelum isolat bisa dibuat vaksin terlebih dahulu melakukan uji untuk mengetahui apakah isolat tersebut bersifat antigenik untuk itu dilakukan uji Postulat Koch.

Postulat Koch atau Postulat Henle-Koch ialah 4 kriteria yang dirumuskan Robert Koch pada 1884. Menurut Koch, keempatnya harus dipenuhi sebelum pathogen yang dianggap sebagai penyebab

penyakit. Kriteria postulat-postulat Koch disebutkan, untuk menetapkan suatu organisme sebagai penyebab penyakit, maka organism tersebut harus memenuhi sejumlah syarat. Pertama, ditemukan pada semua kasus dari penyakit yang telah diperiksa. Kedua, telah diolah dan dipelihara dalam kultur murni (*pure culture*). Ketiga, mampu membuat infeksi asli (*original infection*), meskipun sudah beberapa generasi berada dalam kultur. Keempat, dapat diperoleh kembali dari hewan yang telah diinokulasi dan dapat dikulturkan kembali.

Tujuan dari penelitian ini adalah

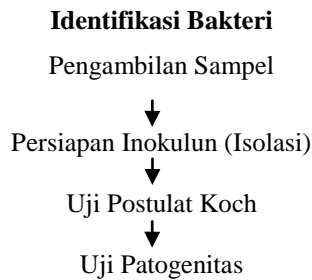
1. Menguji bakteri *Pasteurella multocida* yang di isolat dari kerbau rawa di HSU bersifat pathogen dan menyebabkan penyakit SE (*Septicemia Epizootica*).
2. Isolat lokal *Pasteurella multocida* terpilih dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin.

II. KEGIATAN PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Analis Kesehatan POLTEKKES KEMENKES BANJARMASIN di Banjarbaru Kalimantan Selatan. Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan dengan kegiatan meliputi persiapan (2 minggu), pelaksanaan penelitian (5 minggu), dan pengolahan data hasil dan laporan skripsi (5 minggu).

Bagan alur penelitian



Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan metode Tabulasi Data yaitu melihat organ/cairan yang akan diperiksa dan pencatatan hasil pengamatan:

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Infeksi *P. multocida* pada percobaan (Mencit)

Setelah dilakukan penghitungan kandungan kuman *P. multocida* yang akan diinfeksi pada hewan, ternyata didapat 4×10^8 CFU/ml (1,5 McFarland Scale) kultur. Sebanyak 0,1 ml kultur disuntikkan secara sub cutan pada hewan percobaan mencit.

Gejala klinis setelah infeksi

Setelah diinfeksi mencit mengalami kenaikan suhu tubuh mencapai puncaknya pada 8 jam setelah infeksi dengan suhu 39°C. Sedangkan [12] yang menyatakan pada ternak kerbau bahwa kenaikan suhu hingga 41°C dicapai 12 jam sesudah infeksi, perbedaan ini kemungkinan karena cara infeksi yang berbeda yaitu diberikannya secara oral. Gejala yang dapat diamati pada mencit adalah kemerahan pada mata dan keluarnya cairan hidung, kemudian mencit mengalami kematian pada 24 jam setelah infeksi Hasil pemantauan gejala klinis setelah infeksi dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Pemantauan gejala klinis setelah di infeksi

Waktu Ekspe- rimen	Suhu tubuh				Gejala klinis			
	Mencit 1	Mencit 2	Mencit 3	Mencit 4 (kontrol)	Mencit 1	Mencit 2	Mencit 3	Mencit 4 (kontrol)
0 jam	35°C	36°C	36°C	35°C	Normal	Normal	Normal	Normal
4 jam	36°C	37°C	37°C	35°C	Normal	Normal	Normal	Normal
8 jam	37°C	38°C	37°C	36°C	Normal	Normal	Normal	Normal
12 jam	37°C	37°C	37°C	35°C	Normal	Normal	Normal	Normal
16 jam	37°C	38°C	37°C	36°C	Normal	Normal	Normal	Normal
20 jam	36°C	38°C	38°C	36°C	Normal	Normal	Normal	Normal
24 jam	37°C	38°C	38°C	36°C	Mata merah, Keluar cairan hidung	Mata merah, Keluar cairan hidung	Mata merah, Keluar cairan hidung	Normal
28 jam	38°C	38°C	39°C	36°C	Gejala demam semakin parah dan menyebabkan kematian pada mencit	Gejala demam semakin parah dan menyebabkan kematian pada mencit	Gejala demam semakin parah dan menyebabkan kematian pada mencit	Normal
32 jam	Mati	39°C	Mati	36°C	-	Gejala demam semakin parah dan menyebabkan kematian pada mencit	-	Normal

Data hasil penelitian dilakukan di laboratorium Peternakan UNLAM tanggal 27 April 2015

Perubahan patologi

Perubahan patologi yang terjadi pada organ mencit seperti paru, limpa, dan jantung adalah warna ketiga organ tersebut sudah tidak seperti warna normal yang berwarna merah segar tetapi sudah berwarna hitam dan organ juga hancur saat akan diambil.

Hasil Pengujian Postulat Koch

Teknik postulat Koch meliputi empat tahapan, yaitu asosiasi, isolasi, inokulasi, dan reisolasi. Asosiasi yaitu menemukan gejala penyakit dengan tanda penyakit (pathogen) pada ternak atau bagian ternak yang sakit. Isolasi yaitu membuat biakan murni pathogen pada media buatan (pemurnian biakan) BHI Agar. Inokulasi yaitu menginfeksi hewan percobaan (mencit) yang sehat dengan pathogen hasil isolasi bertujuan mendapatkan gejala yang sama dengan tahapan asosiasi. Reisolasi yaitu mengisolasi kembali pathogen hasil inokulasi untuk mendapatkan biakan pathogen yang sama dengan tahap isolasi. Untuk hasil reisolasi pada Tabel II :Hasil dari penelitian uji postulat Koch seperti pada tabel dibawah ini

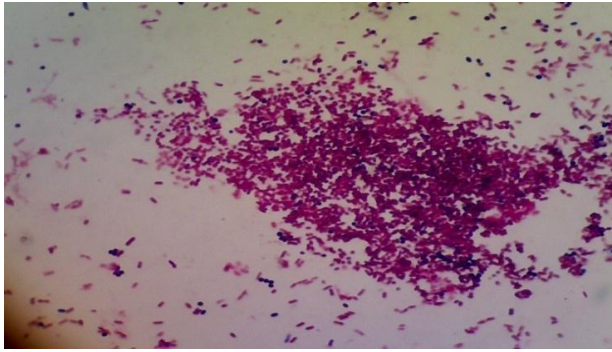
Tabel II. Hasil dari penelitian uji postulat Koch

Organ	Sesudah kematian		
	15 jam	35 jam	59 jam
Paru - paru	+	+	+
Jantung	+	+	+
Limpa	+	+	+

Data hasil penelitian dilakukan di laboratorium Analis Kesehatan Poltekkes KEMENKES Banjarmasin tanggal 05 Mei 2015

Dari hasil pemeriksaan sampel paru, limpa, dan jantung hasil isolasi ditemukan tiga sampel tersebut positif bakteri *P. multocida*. Dari pewarnaan Gram dan pemeriksaan mikroskopis, bakteri berbentuk coccobacillus (batang pendek), bersifat Gram negatif, dan berantai pendek. Koloni berbentuk bulat dengan permukaan cembung. Hal ini sesuai dengan pernyataan [14] bahwa *P. multocida* merupakan bakteri Gram-negatif bentuk batang pendek yang secara normal hidup di nasofaring.

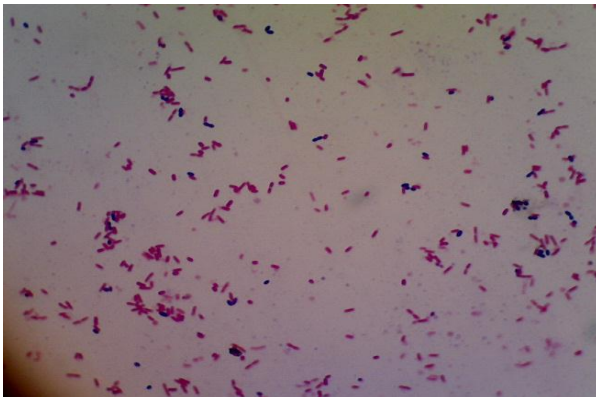
Pewarnaan Gram adalah teknik pewarnaan diferensial yang paling banyak digunakan dalam bakteriologi. Pewarnaan ini memisahkan bakteri menjadi dua kelompok, yaitu Gram positif dan Gram negative. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu gelap, sementara bakteri Gram negatif akan berwarna merah atau merah muda [10]. Bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian mengambil zat warna kedua yaitu safranin yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan ini disebabkan oleh perbedaan struktur kedua kelompok bakteri tersebut [16]. Hasil pewarnaan Gram untuk setiap organ pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 (organ paru – paru), Gambar 2 (organ jantung), dan Gambar 3 (organ limpa).



Gambar 1. Pewarnaan Gram Bakteri *P. multocida* pada Organ paru – paru pembesaran 100 x di bawah mikroskop



Gambar 2. Pewarnaan Gram B/akteri *P. multocida*. pada organ jantung pembesaran 100 x di bawah mikroskop.

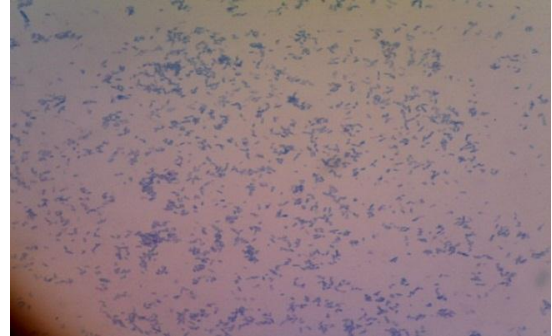


Gambar 3. Pewarnaan Gram bakteri *P. multocida* pada organ limpa pembesaran 100 x di bawah mikroskop.

Dari beberapa gambar pewarnaan *Gram* diatas dapat dilihat bahwa bentuk koloni bakteri bermacam – macam, hal ini sesuai dengan pernyataan Priadi & Natalia (2000) bahwa koloni *P. multocida* tidak selalu seragam, tergantung beberapa faktor, misalnya media yang digunakan, umur bakteri dalam penyimpanan, frekuensi pemindahan bakteri, dan sebagainya. Koloni bakteri yang baru diisolasi dari penderita atau hewan percobaan biasanya berbentuk mukoid (berlendir) dan semakin lama menjadi bentuk *smooth* (halus) atau *rough* (kasar). Bakteri *P. multocida* menimbulkan gas yang berbau.

Setelah pewarnaan *Gram* dilakukan maka dilanjutkan dengan pewarnaan spora dari koloni terpisah yang telah diketahui *Gram* negatif. *P. multocida* merupakan bakteri yang tidak memiliki spora. Spora terbentuk dalam sel sehingga seringkali disebut sebagai endospora, dalam sel

bakteri hanya terdapat satu spora. Endospora tidak mudah ditembus zat warna sehingga tidak dapat diwarnai dengan cara yang lazim. Pewarnaan spora memerlukan pemanasan agar zat warna dapat meresap ke dalam spora. Zat warna pertama mengandung hijau malakit (*malachite green*) yang akan mewarnai endospora menjadi hijau dan safranin sebagai zat warna kedua akan mewarnai sel vegetatif menjadi merah. Zat warna ini tidak berikatan erat dengan dinding sel dan sitoplasma sehingga mudah terlepas sewaktu pencucian dengan air. Sebaliknya, air tidak dapat menembus dinding endospora sehingga spora tetap bewarna hijau sewaktu pencucian dengan air [16]. Hasil pewarnaan Spora pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4 (organ paru – paru).



Gambar 4. Pewarnaan Sporan bakteri *P. multocida* pada organ paru – paru pembesaran 100 x di bawah mikroskop.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan antara lain adalah :

1. Bakteri *Pasteurella multocida* yang di isolasi dari kerbau rawa di HSU bersifat pathogen dan dapat menyebabkan penyakit SE (*Septicemia Epizootica*).
2. Isolat lokal *Pasteurella multocida* yang terpilih dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin.

Saran

Diharapkan adanya penelitian lanjutan terhadap identifikasi bakteri *P. multocida* dari hewan percobaan dan dilakukan uji untuk mengetahui karakter pada bakteri *P. multocida* melalui uji fenotipik.

Referensi

- [1] Azzad, AK., J.G. Coote, dan R. Parton. 1992. Berbeda plasmid profil *Pasteurella haemolytica* serotype dan karakterisasi dan amplifikasi pada *Escherichia coli* resisten ampisilin-plasmid encoding ROB-1/Mactamase J. Mikrobiologi.
- [2] Boogard, A.E., N. London, C. Driseen, dan E.E. Stobberigh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry. Poultry farmer and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemotherapy.
- [3] Brander, G.C., D.M. Pugh, R.J. Baywater, and W.L. Jenkins. 1991. Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. 5thed. The English Book Society. Bailliere Tindal, London.
- [4] Buddle, J.R. 1985. Animal Health in Australia. Bacterial and Fungal Disease of Pigs. Vol 6. Australia Government Publishing Service, Canberra.
- [5] Carter. G.R., G.W. Claus and Y. Rikihisa. 1986. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Third Edition. Lea & Febiger.
- [6] Chancellor, R., A. Priadi, L. Natalia, dan A. Syamsudin. 1996. Tinjauan Penyakit Ngorok atau Septicaemia Epizootica (SE). Prosiding Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner, Cisarua, Bogor.

- [7] De Alwis, M.C.L. 1993. Pasteurellosis in Production Animals: A Review. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
- [8] De Alwis, MCL, 1999. Hemoragik Septikemia. Australia Pusat Pertanian Internasional.
- [9] Direktorat Kesehatan Hewan. 1977. Septicaemia Epizootica (SE). Dalam Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Lokakarya Penyusunan Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Cisarua, Bogor. Tahun 1976. Hal 37-48.
- [10] Harley, H and J. Presscot. 2002. Laboratory Exercise in Microbiology. McGraw-Hill Publisher, USA.
- [11] Herliani dan A. Sulaiman, 2007. Pengembangan Vaksin Protein Murni Bakteri *P. multocida* Untuk Pengendalian Penyakit Kolera Pada Itik Alabio P:76.
- [12] HORADAGODA, N.U., M.C.L DE ALWIS, T.G WIJEWARDANA, K. BELAK, AI.U. GOMIS, and AA VILULASIRI. 1991. Experimental Haemorrhagic Septicaemia in Buffalo Calves. Proceedings of The Fourth International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia, Sri Lanka 11- 15 February 1991: 73-81.
- [13] Kamiso, H.N. 1990. *Vaksinasi Penyakit Bakterial pada Ikan*. PAU-Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- [14] Kuhnert, P., P. Boerlin, S. Emler, M. Krawinkler, and J. Frey. 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. septica by 16S RNA gene sequencing. Int. J. Med. Microbiol. 290:599-604.
- [15] Kodama, H., M. Matsumoto and L.M. Snow. 1981. Immunogenicity of Capsular Antigens of *Pasteurella multocida* in Turkeys. Am. J. Vet. Res. 42:1838-1841.
- [16] Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- [17] Losos, G.L. 1986. *Infectious tropical diseases of domestic animals*. Longman, Harlow, Essex, pp. 718 – 738.
- [18] Mosier, D.A., A.W. Confer and R.J. Panciera. 1989. The Evolution of Vaccines for Bovine Pneumonia Pasteurellosis. Res. Vet. Sci. 47:1-10.
- [19] Natalia L, Priadi A. 2006. Penyakit Septicaemia Epizootica: Penelitian dan Usaha Pengendaliannya pada Sapi dan Kerbau di Indonesia. Dalam: *Puslitbang Peternakan .Prosiding Lokakarya Nasional Ketersediaan IPTEK dalam Pengendalian Penyakit Strategis pada Ternak Ruminansia Besar*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. 12 juli 2006. Hal 53-67.
- [20] Priadi, A dan L. Natalia. 2000. Patogenesis SE pada sapi bali dan kerbau. Gejala klinis, perubahan patologis, reisolasi, deteksi *P. multocida* dengan media kultur dan PCR. JITV. 5(1):65-71.
- [21] Ringler, D.H., G.K. Peter, C.E. Chrisp and D.F. Kere. 1985. Protection of Rabbits against Experimental Pasteurellosis by vaccination with Potassium Thiocyanate Extract of *Pasteurella multocida*. Infect. Immune. 49:498-504.
- [22] Ryu, H. and M.L. Kaberle. 1986. Immunogenicity of Potassium Thiocyanate Extract of Type a *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol. 11:373-385.
- [23] Subronto. 2008. Ilmu Penyakit Ternak Gajah mada University Press. Yogyakarta.
- [24] Woodcock, J.B. 1992. The Biology of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. In *Pasteurella in Production animals*. 25 – 34 An International Workshop for Pasteurellosis, ACIA.