

Pengaruh Proses *Freeze-Drying* dan Penyimpanan pada Suhu Kamar terhadap Viabilitas dan Patogenisitas Plasma Nutfah Mikroba *Pasteurella Multocida*

Siti Chotiah

Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

The effect of *freeze-drying* process and preserving in a vacuum at room temperature against viability and pathogenicity of veterinary microbe germ plasma of *Pasteurella multocida* BCC 2331 was investigated at Balitvet. The aim of this study was to find out the most effective and efficient conservation method. As much as $5,2 \times 10^{11}$ colony forming unit (CFU)/ml of bacteria suspension in 7.5% glucose serum as the preservation medium being pathogenic in mice with LD₅₀ of 9,8 CFU/ml was freeze dried then stored at room temperature ($\pm 27^\circ\text{C}$) until the study was completed. Viability and pathogenicity test were done immediately after the process, 1 and 2 months after storage. The results showed that there were viability decreases amounted $1,3 \times 10^1$ CFU/ml, 10^2 CFU/ml and $8,2 \times 10^2$ CFU/ml due to the effects of the process, one month and two-month storage respectively. The decreases of pathogenicity on mice were shown by the increases of LD₅₀ amounting log 1, log 2, and log 3 a day after the process, one month and two-month storage respectively.

Key words: *Pasteurella multocida*, conservation, viability, pathogenicity.

ABSTRAK

Pengaruh proses kering beku dan penyimpanan hasil proses pada suhu kamar 27°C terhadap viabilitas dan patogenisitas plasma nutfah mikroba veteriner telah dipelajari di Balitvet untuk menentukan cara pelestarian yang efektif dan efisien. Dalam kegiatan ini dipakai bakteri *Pasteurella multocida* koleksi Balitvet *Culture Collection* nomor koleksi B2331. Suspensi bakteri sebanyak $5,2 \times 10^{11}$ coloni forming unit (CFU)/ml dalam medium preservan 7,5% glukosa, serum dan bersifat patogen pada mencit dengan LD₅₀ 9,8 CFU/ml diproses kering beku, kemudian disimpan pada suhu kamar ($\pm 27^\circ\text{C}$) sampai penelitian selesai. Uji viabilitas dan patogenisitas dilakukan langsung setelah proses dan pada 1 serta 2 bulan setelah penyimpanan. Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan viabilitas sebanyak $1,3 \times 10^1$ CFU, dan $8,2 \times 10^2$ CFU/ml masing-masing karena pengaruh proses, pengaruh penyimpanan selama 1 dan 2 bulan. Patogenisitas pada mencit menurun yang ditandai oleh adanya peningkatan LD₅₀ sebanyak log 1, log 2, dan log 3 masing-masing 1 hari setelah proses, 1 dan 2 bulan setelah penyimpanan.

Kata kunci: *Pasteurella multocida*, konservasi, viabilitas, patogenisitas.

PENDAHULUAN

Plasma nutfah mikroba penting artinya dalam pembangunan pertanian di masa mendatang. Hal ini menjadi lebih penting bila dihubungkan dengan perkembangan bioteknologi, karena mikroba melalui rekombinasi DNA, fusi sel, dan teknik bioproses terbukti memegang peranan dalam dunia industri, pertanian, kesehatan, dan lingkungan. Mikroba tidak hanya digunakan untuk proses konvensional seperti *brewing* dan *baking*, fermentasi tradisional (tempe, kecap, oncom, tauco), produksi asam organik (asam cuka, asam laktat), asam amino (glutamat), dan obat-obatan (antibiotik, vaksin), tetapi juga diperlukan sebagai sumber genetik, khususnya dalam merakit jasad hidup transgenik. Untuk itu, potensi plasma nutfah mikroba perlu terus digali agar dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Pemanfaatan kekayaan plasma nutfah harus diimbangi dengan upaya pelestariannya agar tidak terjadi erosi genetik. Pelestarian mikroba yang dilakukan melalui suatu koleksi kultur yang beroperasi secara profesional menjamin tersediaan biakan mikroorganisme hidup yang memiliki sifat-sifat yang stabil sehingga dapat dimanfaatkan oleh semua ilmuwan mikrobiologi maupun bioteknologi. Balai Besar Penelitian Veteriner (BB Balitvet) merupakan satu-satunya institusi penelitian untuk bidang veteriner di Indonesia, yang memiliki unit koleksi mikroba yang disebut Balitvet *Culture Collection* (BCC).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi veteriner telah memanfaatkan plasma nutfah mikroba untuk produksi vaksin, antigen, toksin/antitoksin, bahan diagnostik, serum kebal, uji efikasi obat, probiotik, dan lainnya. Teknologi pembuatan vaksin dan perangkat diagnostik untuk mendeteksi dan mencegah berbagai penyakit yang dapat terjadi

pada ternak yang sudah ada di Indonesia maupun impor akan berkembang pesat seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Teknologi veteriner menggunakan plasma nutfah mikroba koleksi BCC yang siap dilepas antara lain adalah vaksin inaktif ND yang mengandung virus ND dari isolat lokal galur velogenik (ganas) yang telah dilemahkan, vaksin inaktif *Infectious Bronchitis* (IB) yang mengandung isolat lokal IB, I-37, I-269, dan PTS-3, vaksin Gumboro atau *Infectious Bursal Disesae* (IBD) yang mengandung virus lokal IBD, vaksin ETEC dan EPEK untuk sapi mengandung isolat lokal *Eschericia coli* enterotoksigenik yang memiliki antigen pelekatan *E. coli* K99 dan *E. coli* enteropatogenik, vaksin CLOSTVAC-MULTI berisi toksoid isolat lokal bakteri *Clostridium perfringens* tipe A, C, dan D, dan vaksin ETEC untuk babi yang mengandung bakteri isolat lokal *Eschericia coli* yang memiliki antigen K88, K99, F41, dan 987 P (Puslitbang Peternakan 2001).

Metode yang dipakai dalam konservasi mikroorganisme; koleksi kultur adalah metode *subculture*, *drying*, *freeze-drying*, dan *freezing*. Akan tetapi tidak mudah memilih metode terbaik untuk keperluan tertentu, sehingga pemilihan metode ditentukan sendiri oleh koleksi kultur masing-masing berdasarkan kemampuan fasilitas dan dana yang tersedia (Snell 1991). Metode *freeze-drying* dipakai dalam konservasi sebagian besar koleksi mikroba di BCC. Metode ini digunakan untuk mengawetkan mikroorganisme dan banyak digunakan untuk kapang, khamir, bakteri, dan virus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan viabilitas dan patogenisitas mikroba koleksi BCC selama proses *freeze-drying* dan penyimpanan pada suhu kamar tanpa pendingin, untuk menentukan cara pelestarian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Isolat Bakteri

Sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah plasma nutfah *Pasteurella multocida* koleksi BCC nomor B2331 hasil isolasi dari itik sakit menderita kolera unggas di Pemalang, Jawa Tengah, pada tahun 1994. Isolat tersebut merupakan koleksi

yang dipakai sebagai bahan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen pada penelitian pengembangan vaksin kolera unggas (Supar *et al.* 2001).

Hewan Percobaan

Mencit putih galur DdY umur 4 minggu dengan bobot badan sekitar 20 g sebanyak 140 ekor dibagi menjadi empat kelompok, yaitu A, B, C, dan D. Masing-masing kelompok dibagi menjadi tujuh subkelompok. Masing-masing subkelompok terdiri atas 5 ekor mencit, dikandangkan secara terpisah. Subkelompok $A10^{-4}$, $A10^{-5}$, $A10^{-6}$, $A10^{-7}$, $A10^{-8}$, $A10^{-9}$, dan $A10^{-10}$ dipakai untuk uji patogenisitas sebelum proses *freeze-drying*. Subkelompok $B10^{-4}$, $B10^{-5}$, $B10^{-6}$, $B10^{-7}$, $B10^{-8}$, $B10^{-9}$, dan $B10^{-10}$ dipakai untuk uji patogenisitas setelah proses *freeze-drying*. Subkelompok $C10^{-4}$, $C10^{-5}$, $C10^{-6}$, $C10^{-7}$, $C10^{-8}$, $C10^{-9}$, dan $C10^{-10}$ dipakai untuk uji patogenisitas 1 bulan setelah penyimpanan. Subkelompok $D10^{-4}$, $D10^{-5}$, $D10^{-6}$, $D10^{-7}$, $D10^{-8}$, $D10^{-9}$, dan $D10^{-10}$ dipakai untuk uji patogenisitas 2 bulan setelah penyimpanan.

Reidentifikasi Isolat dari Kultur Bentuk Liofilisasi

Isolat dalam awetan ampul liofilisasi 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 larutan. Kemudian isi ampul diinokulasikan ke dalam medium kaldu BHI, untuk selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam. Untuk mengetahui kemurnian bakteri tersebut, kultur dipindahbiakkan dengan cara menginokulasikan satu ose (bermata) kultur tersebut 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 (1973) dan Cowan (1974). Identifikasi tahap pertama diuji dengan pewarnaan Gram, pergerakan dalam medium semi solid, pertumbuhan pada medium agar pada kondisi aerobik, kemampuan pembentukan enzim katalase dan oksidase, pembentukan asam dari glukosa dan tipe reaksi pemecahan karbohidrat pada tahap kedua dilakukan uji reaksi biokimia, antara lain terbentuknya

asam dari beberapa karbohidrat (arabinose, laktose, maltose, salisin, sorbitol, sukrose, manitol), terben-
tuknya indol, uji enzim ureas, dan pertumbuhan
pada medium padat *Mc. Conkey*.

Viabilitas (Kemampuan untuk Tumbuh) Isolat

Viabilitas Sebelum Proses *Freeze-Drying*

Isolat yang sudah direidentifikasi disubkultur
dalam medium agar darah, kemudian diinkubasikan
pada suhu 37°C selama satu malam. Kultur mumi
sebanyak tiga cawan petri dipanen, kemudian dima-
sukkan ke dalam medium preservan 7,5% glukosa
serum kuda langsung diproses *freeze-drying* meng-
gunakan alat/mesin *freeze-dry* (EDWARD, Inggris)
untuk diawetkan sebanyak 10 ampul ukuran 1 ml.

Pada waktu yang sama bagian lain dari kultur
tersebut diambil 1 ml, selanjutnya diencerkan dalam
phosphate buffered saline (PBS) pH 7,3 dengan
kelipatan 10, mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai
 10^{-10} . Dua puluh lima μ l dari masing-masing sus-
pensi biakan tadi, pada pengenceran 10^{-6} sampai de-
ngan 10^{-9} , diinokulasikan pada medium agar darah,
masing-masing pengenceran dilakukan tiga ulang-
an. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama
satu malam, jumlah koloni yang tumbuh kemudian
dihitung untuk menentukan jumlah bakteri yang
tumbuh dalam *colony forming unit* (CFU)/ml sebe-
lum dilakukan proses *freeze-drying*. Sebagian lain
dari masing-masing suspensi pada pengenceran 10^{-4}
sampai dengan 10^{-10} akan disuntikkan berturut-turut
kepada mencit di masing-masing subkelompok
A 10^{-4} , A 10^{-5} , A 10^{-6} , A 10^{-7} , A 10^{-8} , A 10^{-9} , dan A 10^{-10}
yang akan dipakai pada uji patogenesis sebelum
proses *freeze-drying*.

Viabilitas Setelah Proses *Freeze-Drying* dan Setelah Penyimpanan

Sembilan awetan ampul yang sudah diproses
freeze-drying disimpan pada suhu kamar ($\pm 27^\circ\text{C}$)
selama 1 hari, 1 bulan, dan 2 bulan. Masing-masing
sebanyak ampul dalam waktu yang berbeda dipo-
tong leher kaca ampul memakai alat pemotong ge-
las. Isi ampul dilarutkan ke dalam 1 ml PBS pH 7,3
kemudian diencerkan dengan kelipatan 10, mulai
dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} . Sebanyak 25 μ l
dari masing-masing suspensi biakan tadi, pada pe-

ngenceran 10^{-6} sampai dengan 10^{-9} , diinokulasikan
pada medium agar darah, pengenceran dilakukan
dengan tiga ulangan. Setelah diinkubasikan pada
suhu 37°C selama satu malam, jumlah koloni yang
tumbuh kemudian dihitung untuk menentukan jum-
lah bakteri dalam CFU/ml. Sebagian dari suspensi
pada pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-10} akan disuntik-
kan berturut-turut kepada mencit di subkelompok
B 10^{-4} , B 10^{-5} , B 10^{-6} , B 10^{-7} , B 10^{-8} , B 10^{-9} , dan B 10^{-10}
yang akan dipakai pada uji patogenesis sesudah
proses *freeze-drying*. Sebagian lagi dari suspensi
pada pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-10} akan disuntik-
kan kepada mencit di subkelompok C 10^{-4} , C 10^{-5} ,
C 10^{-6} , C 10^{-7} , C 10^{-8} , C 10^{-9} , dan C 10^{-10} yang akan
dipakai pada uji patogenesis 1 bulan sesudah
penyimpanan. Sebagian lain dari suspensi pada
pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-10} akan disuntikkan ke-
pada mencit di subkelompok D 10^{-4} , D 10^{-5} , D 10^{-6} ,
D 10^{-7} , D 10^{-8} , D 10^{-9} , dan D 10^{-10} yang akan dipakai
pada uji patogenesis 2 bulan sesudah penyimpan-
an.

Patogenesis Isolat pada Mencit

Patogenesis Sebelum Proses *Freeze-Drying*

Sebanyak 0,2 ml dari masing-masing suspen-
si pada pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-10} disuntikkan
kepada mencit di subkelompok A 10^{-4} , A 10^{-5} , A 10^{-6} ,
A 10^{-7} , A 10^{-8} , A 10^{-9} , dan A 10^{-10} dengan aplikasi
subkutan. Mencit-mencit tersebut diamati selama 14
hari dan dicatat jumlah mencit yang mati dari
masing-masing kelompok perlakuan. Dosis letal
50% (LD₅₀) dalam CFU/ml pada mencit ditentukan
dengan memakai metode Karber (1931).

Patogenesis pada Mencit setelah Proses *Freeze- Drying* dan Setelah Penyimpanan

Sebanyak 0,2 ml dari masing-masing suspen-
si pada pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-10} disuntikkan
kepada mencit di subkelompok B 10^{-4} , B 10^{-5} , B 10^{-6} ,
B 10^{-7} , B 10^{-8} , B 10^{-9} , dan B 10^{-10} subkelompok C 10^{-4} ,
C 10^{-5} , C 10^{-6} , C 10^{-7} , C 10^{-8} , C 10^{-9} , dan C 10^{-10} , sub-
kelompok D 10^{-4} , D 10^{-5} , D 10^{-6} , D 10^{-7} , D 10^{-8} , D 10^{-9} ,
dan D 10^{-10} pada 1 hari, 1 bulan, dan 2 bulan setelah
penyimpanan pada suhu kamar, dengan aplikasi
subkutan. Mencit perlakuan diamati selama 14 hari
dan dicatat jumlah mencit yang mati dari masing-

masing kelompok perlakuan. LD₅₀ pada mencit dinyatakan dalam CFU/ml dengan memakai metode Karber (1931).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Reidentifikasi Isolat

Hasil reidentifikasi isolat koleksi BCC nomor B2331 adalah *P. multocida*, isolat tumbuh dan tidak membentuk zona hemolisis dalam medium agar darah, tidak tumbuh dalam medium agar *Mc. Concey*, morfologi batang pendek, kokoid, pewarnaan gram negatif, non motil, katalase, dan oksidase positif uji gula-gula menunjukkan positif terhadap manitol, sorbitol, sukrosa, galaktosa, dan negatif terhadap laktosa dan salisin.

Viabilitas Isolat

Proses *freeze-drying* bakteri *P. multocida* dalam kegiatan ini merupakan proses perpindahan air secara sublimasi dari suspensi mikroba dalam medium 7,5% glukosa serum yang dibekukan dalam keadaan vakum. Proses tersebut sangat berpengaruh terhadap kestabilan sel mikroba. Biasanya untuk

menghilangkan atau mengurangi pengaruh tersebut digunakan medium tertentu, bergantung kepada jenis mikroba. Beberapa medium dipakai untuk sebagian besar bakteri, antara lain 7,5% glukosa seruni 7,5% kaldu glukosa, *mist dessican*, dan lain-lain (Lapage *et al.* 1970).

Viabilitas *P. multocida* koleksi BCC nomor B2331 sebelum proses *freeze-drying* dalam medium preservan 7,5% glukosa serum 1 hari, 1 bulan, dan 2 bulan setelah penyimpanan pada suhu kamar disajikan dalam Tabel 1. Penurunan viabilitas pada 1 hari setelah proses, 1 bulan, dan 2 bulan setelah penyimpanan pada suhu kamar masing-masing sebanyak $1,3 \times 10^1$ CFU, $1,3 \times 10^3$ CFU, dan $9,5 \times 10^3$ CFU/ml. Penurunan viabilitas sebanyak log 1 dengan penelitian ini dinilai wajar karena penurunan viabilitas sampai log 2 merupakan hal yang biasa pada mikroba yang sensitif (Snell 1991). Penyimpanan pada suhu kamar ($\pm 27^\circ\text{C}$) akan menurunkan viabilitas sebanyak 10^2 CFU dan $8,2 \times 10^2$ CFU/ml. Penyimpanan mikroba setelah proses *freeze-drying* pada temperatur tinggi akan menyebabkan kehilangan viabilitas (Rudge 1991), karena itu, penyimpanan mikroba yang sensitif sebaiknya refrigerator atau pada suhu rendah.

Tabel 1. Perubahan viabilitas *P. multocida* (nomor BCC B2331) sebelum proses *freeze-drying* dan setelah penyimpanan pada suhu kamar ($\pm 27^\circ\text{C}$).

Ulangan ke-	Jumlah bakteri dalam <i>coloniforming unit</i> (CFU)/ml			
	Sebelum proses <i>freeze-drying</i>	Sesudah proses <i>freeze-drying</i>		
		1 hari	1 bulan	2 bulan
1	5×10^{11}	$1,6 \times 10^{10}$	10^8	$0,5 \times 10^8$
2	$5,2 \times 10^{11}$	$5,6 \times 10^{10}$	$0,4 \times 10^9$	2×10^7
3	$5,4 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$
Rata-rata	$5,1 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$

Tabel 2. Perubahan patogenisitas *P. multocida* (nomor BCC 233 1) sebelum proses *freeze-drying* dan setelah penyimpanan pada suhu kamar ($\pm 27^\circ\text{C}$).

Sebelum proses <i>freeze-drying</i>	50% dosis letal pada mencit (CFU/ml)		
	Sesudah proses <i>freeze-drying</i>		
	1 hari	1 bulan	2 bulan
9,8	2×10^2	10^3	10^4

Patogenisitas Isolat terhadap Mencit

Patogenisitas *P. multocida* terhadap mencit sebelum proses *freeze-drying* dalam medium preservan 7,5% glukosa serum, 1 hari, 1 bulan, dan 2 bulan setelah penyimpanan pada suhu kamar disajikan pada Tabel 2. Proses *freeze-drying* dapat meningkatkan LD₅₀ sebanyak 20 CFU/ml, dan penyimpanan pada suhu kamar selama 1 dan 2 bulan meningkatkan LD₅₀ masing-masing 8 CFU dan 80 CFU/ml. Proses *freeze-drying* dan penyimpanan pada suhu kamar selama 1 dan 2 bulan menurunkan patogenisitas masing-masing sebanyak 20 CFU, 8 CFU, dan 80 CFU/ml.

Muraoka *et al.* (1985) telah menggunakan campuran *calf* serum, kaldu nutrien, galaktose, dan Na Cl sebagai medium preservan pada proses *freeze-drying* bakteri *Pasteurella piscicida* sehingga dapat mempertahankan patogenitasnya sampai 6 bulan. Vaksin hidup avian pasteurellosis yang dikemas dalam ampul kering beku menggunakan medium preservan tertentu lebih baik daripada menggunakan medium sukrose gelatin (Yarnikh *et al.* 1990).

KESIMPULAN

Metode *freeze-drying* menggunakan medium preservan 7,5% glukosa serum kuda yang dipakai dalam konservasi plasma nutfah mikroba veteriner *P. multocida* nomor BCC B2331 dapat menurunkan viabilitas dan patogenisitas, baik selama proses maupun setelah penyimpanan pada suhu kamar $\pm 27^{\circ}\text{C}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Wawan Sugiawan dan Sdr. Sukatma yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. 2001. Ekspose Inovasi Teknologi Peternakan, 5 Juni 2001. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian. hlm. 14-19.
- Carter, G.R. 1973. Diagnostic Procedure in Veterinary Microbiology 2nd ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA.
- Cowan, S.T. 1974. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Ames, Iowa, USA.
- Karber, G. 1931. Beitrag zur leollectiven behandlung pharmacologischer, Reichenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162:480-487.
- Lapage, S.P., Jean E. Shelton, T.G. Mitchell, and A.R. Mackenzie. 1970. Culture collection and the preservation of bacteria. In Methods in Microbiolov. Academic Press London and New York. 3A:130-228.
- Muraoka, A., S. Hashimoto, and R. Kusuda. 1985. Preservation of *Pasteurella piscicida* by *freeze-drying*. Bull. Jap. Soc. Scien Fish. 51(10):1659-1663.
- Rudge, R.H. 1991. Maintenance of bacteria by *freeze-drying*. In Kirsop, B.E. and A. Doyle (Eds.). Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. Academic Press Limited. p. 31-43.
- Snell, J.J.S. 1991. General introduction to maintenance methode. In Kirsop, B.E. and A. Doyle (Eds.). Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. Academic Press Limited. p. 21-30.
- Supar, Y. Setiadi, Djaenuri, N. Kurniasih, B. Purwadikatta, dan Syafei. 2001. Pengembangan vaksin kolera unggas: 1. Proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada ayam terhadap uji tantang galur homolog dan heterolog. J. Ilmu Ternak Vet. 6(1):59-67.
- Yarnikh, V.S., P.N. Dushuk, R.V. Dushuk, T.V. Ogorodnikova, I.S. Dubrov, V.I. Sitkov, and V.I. Zaerko. 1990. Stabilizing medium for *freeze-drying* production batches of live vaccine against avian pasteurellosis. Veterinariya Moskva 1:63-64.