

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BIOKIMIWI *Pasteurella multocida* ASAL SAPI YANG DIPOTONG DI RUMAH PEMOTONGAN HEWAN (RPH) CAKUNG

Sumadi¹⁾, Pasaribu F.H.²⁾, Pudjiatmoko¹⁾, Mariana S.¹⁾, Irawati, T.¹⁾ dan Amijaya, D.¹⁾

¹⁾Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

²⁾Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Pasteurella multocida was isolated from upper respiratory tracts of cattle slaughtered at Cattle Slaughter House in Cakung, East Jakarta. The swab specimens were inoculated onto desoxycholate agar (DSA) and the bacteria was identified based on morphology, Gram stain, haemolysis on the blood agar plate, growth on MacConkey agar media, glucose and lactose fermentation, indole production, oxidase test and catalase test. Ten field isolates were obtained from 91 specimens, namely Pm IL-3, Pm IL-9, Pm IL-13, Pm IL-20, Pm IL-25, Pm IL-30, Pm IL-32, Pm IL-61, Pm IL-71 and Pm IL-76.

PENDAHULUAN

Studi ini dilakukan di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur, Bogor. Spesimen berupa *cotton swab* saluran pernafasan bagian atas sapi sehat yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) sapi Cakung, Jakarta Timur.

P. multocida adalah bakteri Gram negative, berbentuk *coccobacillus* (batang pendek) yang hidup normal pada *nasopharynx* dari berbagai *species* (Kuhnert *et al.*, 2000). Banyak strain bakteri *P. multocida* yang menunjukkan adanya kapsul *polysaccharide* pada permukaannya dan dapat dibedakan secara serologi dengan antigen kapsular ke dalam serotipe A,B, D dan E (Carter, 1967; Rimler and Rhoades, 1989). Untuk mengetahui patogenisitasnya dilakukan uji menggunakan mencit (Boyce and Adler, 2000). Sedangkan Heddlestone *et al.* (1972) berdasarkan komponen *lipopolysaccharida* membedakan serotipe somatik menjadi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 dan 15. Bakteri *P. multocida* ini menyebabkan terjadinya septicaemia dan penyakit saluran pernafasan pada hewan piaraan dan hewan liar (Rimler *et al.*, 1995).

Septicemia epizootica (SE) atau penyakit ngorok merupakan penyakit menular terutama pada sapi, kerbau, kadang-kadang domba, kambing dan kuda yang disebabkan oleh bakteri *P. multocida* tipe tertentu, biasanya berjalan akut, angka kematiannya tinggi, terutama pada penderita yang telah menunjukkan tanda-tanda klinis yang jelas. Sesuai dengan namanya, pada kerbau dan sapi pada stadium

akhir akan menunjukkan gejala ngorok, di samping adanya kebengkakan pada daerah *submandibulla* dan leher bagian bawah, gambaran nekropsinya menunjukkan perubahan sepsis (Anonimus, 1981).

Penyakit ngorok menyebabkan kematian, penurunan berat badan serta kehilangan tenaga kerja pertanian dan pengangkutan. Kerugian akibat penyakit ngorok di Indonesia ditaksir sebesar 5,4 milyar rupiah setiap tahun. Petani sering terpaksa menjual ternaknya di bawah harga pasar untuk dipotong bagi hewan yang dagingnya masih dapat dikonsumsi (Setiawan dan Sjamsudin, 1988).

Studi ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi *P. multocida* dari RPH dalam rangka mencari kandidat seed vaksin untuk penyakit ngorok.

MATERI DAN METODA

Spesimen

Spesimen yang digunakan untuk isolasi *P. multocida* berupa *cotton swab nasopharynx* asal sapi yang dipotong di RPH sapi milik PD. Dharma Jaya di Cakung, Jakarta Timur. Spesimen *cotton swab nasopharynx* yang telah diambil, disimpan di dalam *ice box* dan dibawa ke Laboratorium Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan.

Media

Bahan identifikasi yang digunakan berupa isolat lapang yang didapat pada isolasi tahap awal. Media yang digunakan *Dextrose Starch Agar* (DSA), *Triple Sugar Iron* (TSI), *MacConkey agar*, *Tryptose Broth*

(TB), *Blood agar*, *Nutrient Broth* (NB), *Kovac's reagent*, α -naphthol, 0,1 % *dimethyl-p-phenylenediamine oxalate*, H_2O_2 , *skim milk*, alkohol 70 %, $KMnO_4$ dan formalin.

Isolasi

Isolasi tahap awal dilakukan dengan menginokulasikan spesimen *cotton swab* dari *nasopharynx* pada media DSA yang mengandung kanamisin dan basitrasin masing-masing 200 μ g per ml, kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Biakan bakteri yang tumbuh dimurnikan dengan cara mengambil 1 koloni terpisah dengan ose dan diinokulasikan kembali pada media DSA serta diinkubasi lagi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Biakan bakteri yang telah murni dipanen ke dalam *skim milk* 10 % sebagai isolat lapang dan disimpan pada 2-4 °C. Biakan kuman dalam *skim milk* 10 % ini sebagai isolat lapang diduga bakteri *P. multocida* yang selanjutnya diidentifikasi.

Identifikasi

Identifikasi dilakukan menurut Cowan (1993) dengan sedikit modifikasi. Secara umum identifikasi tersebut dilakukan sebagai berikut :

1. Morfologi dan Pewarnaan Gram

Isolat lapang diduga *P. multocida* dalam *skim milk* 10 % diinokulasi pada media DSA kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Dipilih satu koloni yang terpisah yang iridescent menggunakan ose diinokulasi pada media TB dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Kemudian bakteri dari biakan ini dilakukan pewarnaan Gram menggunakan metoda yang dikemukakan oleh Jawetz *et al.* (1976). Biakan bakteri dalam *tryptose* cair diambil 1 ose, dibuat preparat apus di atas *slide glass*. Preparat apus difiksasi dengan panas. Selanjutnya direaksikan dengan kristal violet selama 1 menit, dicuci dengan air, direaksikan dengan *Gram's iodine* selama 1 menit, dicuci lagi dengan air, dihilangkan pewarnanya selama 10-30 detik dengan aseton 30 ml dan alkohol 70 ml, dicuci lagi dengan air, direaksikan selama 10-30 detik dengan *safranin* (2,5 % larutan *safranin* dalam 95 % alkohol) dicuci dengan air, dikeringkan dan kemudian diamati dengan mikroskop.

2. Hemolisis pada Blood Agar

Untuk mengetahui sifat menghemolisa sel darah merah pada *blood agar plate* dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Dipilih 1 koloni terpisah yang iridescent dengan ose, kemudian diinokulasi pada media *blood agar* 5 % dan diinkubasi pada 37 °C selama 2 hari. Pada akhir inkubasi diamati terjadinya hemolisis.

3. Pertumbuhan pada MacConkey Agar

Untuk mengetahui sifat pertumbuhan pada media *MacConkey* agar, dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang iridescent menggunakan ose diinokulasi pada media *MacConkey* dan diinkubasi pada 37 °C selama 3 hari. Pertumbuhan bakteri diamati setiap hari.

4. Tes Indole

Tes *indole* dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang iridescent menggunakan ose diinokulasi pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Pada akhir pengamatan ditambahkan *Kovac's reagent* sebanyak 0,5 ml ke dalamnya kemudian digoyang, dидiamkan selama 1 menit. Jika terjadi lapisan warna merah pada lapisan reagen mengindikasikan terjadi produksi *indole*.

5. Tes Biokimiawi

Untuk mengetahui sifat fermentasi glukosa dan laktosa dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang iridescent menggunakan ose diinokulasi pada media TSI dan diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Terjadinya warna kuning pada bagian tegak mengindikasikan terjadinya fermentasi glukosa, sedangkan warna kuning pada bagian miring mengindikasikan terjadinya fermentasi laktosa.

6. Tes Oksidase

Tes oksidase dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diamati satu

koloni terpisah yang *iridescent* menggunakan ose diinokulasi pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Pada akhir pengamatan ditambahkan 0,2 ml *-naphthol* dan 0,3 ml *dimethyl-p-phenylenediamine oxalate* ditambahkan ke dalamnya. Warna biru yang terjadi dalam waktu 10-30 detik menunjukkan tes oksidase positif, reaksi lambat yang terjadi 2-5 menit dianggap negatif.

7. Tes Katalase

Tes katalase dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang *iridescent* menggunakan ose diinokulasi pada media *nutrient broth* dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Pada akhir pengamatan ditambahkan 1 ml *hydrogen peroxide* (H₂O₂) ke dalamnya. Terjadinya gelembung mengindikasikan terjadinya oksidase.

8. Tes Urease

Tes urease dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang *iridescent* menggunakan ose diinokulasi pada media *urea broth* dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Pada akhir inkubasi warna merah yang terjadi menunjukkan terjadinya hidrolisa urea ditambahkan 1 ml *hydrogen peroxide* (H₂O₂) ditambahkan ke dalamnya. Terjadinya gelembung mengindikasikan terjadinya oksidase.

9. Tes Motilitas

Tes motilitas dilakukan dengan menginokulasi isolat lapang dalam *skim milk* pada media DSA, diinkubasi pada 37 °C selama 18-24 jam. Diambil satu koloni terpisah yang *iridescent* menggunakan ose diinokulasi pada media *tryptose broth* dan diinkubasi pada 37 °C selama 9-18 jam. Diambil satu ose diletakkan di atas *cover glass*, kemudian dipasang *slide glass* khusus untuk preparat *hanging drop*. Diamati pergerakan bakteri dengan mikroskop dengan posisi *cover glass* di sebelah atas.

pendek yang secara normal hidup di *nasopharynx* pada banyak spesies hewan. Dari 41 spesimen *cotton swab nasopharynx* sapi yang diambil tahap pertama diperoleh 36 isolat bakteri diduga *P. multocida* yang tumbuh pada media DSA yang mengandung kanamisin dan basitrasin masing-masing 200 µg/ml, 3 spesimen tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan 2 spesimen terkontaminasi yang tidak dapat dimurnikan. Sedangkan dari 50 spesimen *cotton swab nasopharynx* sapi yang diambil pada tahap kedua diperoleh 47 isolat bakteri diduga *P. multocida* yang tumbuh pada media DSA yang mengandung kanamisin dan basitrasin masing-masing 200 µg/ml dan 3 spesimen tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil isolasi tahap awal spesimen cotton swab dari nasopharynx hewan sapi yang dipotong di RPH Cakung Jakarta Timur.

No	Pengambilan Spesimen	Jumlah Spesimen	Hasil Inokulasi pada DSA		
			Tumbuh	Tidak Tumbuh	Kontaminasi
1	Tahap Pertama	41	36	3	2
2	Tahap Kedua	50	47	3	0
Jumlah		91	83	6	2

Selanjutnya 83 isolat bakteri diduga *P. multocida* diinokulasikan pada media *MacConkey* dan TSI. Tabel 2 menunjukkan bahwa dari 36 isolat bakteri yang belum teridentifikasi dari specimen yang diambil pada tahap pertama, hanya 4 isolat tidak tumbuh pada media *MacConkey*, memfermentasi glukosa tetapi tidak memfermentasi laktosa dan 3 isolat tidak tumbuh pada media *MacConkey*, memfermentasi glukosa dan laktosa. Sedangkan dari 47 isolat bakteri yang belum teridentifikasi dari specimen yang diambil pada tahap kedua hanya 3 isolat yang tidak tumbuh pada media *MacConkey*, memfermentasi glukosa dan laktosa. Sepuluh isolat lapang yang diduga *P. multocida* yang mempunyai koloni *iridescent*, selanjutnya diberi kode Pm IL-3, Pm IL-9, Pm IL-13, Pm IL-20, Pm IL-25, Pm IL-30, Pm IL-32, Pm IL-61, Pm IL-71 dan Pm IL-76..

HASIL DAN PEMBAHASAN

Menurut Kuhnert *et al.* (2000) bahwa *P. multocida* merupakan bakteri Gram-negatif bentuk batang

Tabel 2. Hasil identifikasi isolat lapang diduga *P. multocida* yang diisolasi dari spesimen cotton swab dari nasopharynx asal sapi yang dipotong di RPH Cakung, Jakarta Timur.

No	Pengambilan Sampel	Jumlah isolat bakteri belum teridentifikasi	Mac Conkey (-) Glucosa (+) Lactosa (-)	Mac Conkey (-) Glucosa (+) Lactosa (-)
1	Tahap Pertama	36	4 (Pm IL-3; Pm IL-13 IL-20; Pm IL-25)	3 (Pm IL-9; Pm IL-30 Pm IL-32)
2	Tahap Kedua	47	3 (Pm IL-61; Pm IL-71; Pm IL-76)	0
Jumlah		83	7	3

Tabel 3. Identifikasi Isolat Lapang *P. multocida* secara Biokimiawi

No	Jenis Uji	Pm IL-3	Pm IL-9	Pm3 IL-13	Pm IL-20	Pm IL-25	Pm0 IL-30	Pm IL-32	Pm IL-61	Pm IL-71	Pm IL-76	Katha ¹⁾
1	Garam	Neg ²⁾	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg
2	Bentuk	Bp ³⁾	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp
3	Hemolisi	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	Motilitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Mac Conkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Lactosa	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
8	Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Catatan : bp = bipoler

Walaupun *P. multocida* secara normal hidup pada saluran pernafasan bagian atas dari hewan sapi, namun dalam penelitian ini hanya didapatkan 10 isolat (10.9%) dari 91 spesimen swab nasopharynx dari sapi yang dipotong di RPH Cakung (Tabel 2). Sedangkan DeRosa et al. (2000) mendapatkan 38 isolat (90%) dari 40 spesimen cotton swab nasopharynx sapi yang menunjukkan gejala klinis gangguan pernafasan.

Kemudian 10 isolat lapang diduga *P. multocida* dilanjutkan identifikasi melalui sifat menghemolisa darah, pewarnaan Gram, morfologi, motilitas, urease,

indole, oksidase dan katalase. Tabel 3 menunjukkan bahwa 10 isolat lapang *P. multocida* tidak menghemolisa darah, Gram-negatif, bentuk batang pendek, non motil, tidak tumbuh pada media MacConkey, memfermentasi glukosa, 7 isolat tidak memfermentase laktosa, positif terhadap tes indol, oksidase dan katalase tetapi negative terhadap test urease, hal ini didukung pendapat Rimler and Rhoades (1989) yang menyatakan bahwa *P. multocida* tidak menghemolisa darah, non motil, tidak tumbuh pada media MacConkey, memfermentasi glukosa, positif

terhadap tes katalase, oksidase dan indole. *P. multocida* biasanya tidak memfermentase laktosa, tetapi pada penelitian ini terdapat 3 isolat yaitu Pm IL-9, Pm IL-30 dan Pm IL-32 yang memfermentasi laktosa dalam pengamatan selama 5 hari, sedangkan 7 isolat yang lain memfermentasi laktosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus.** 1981. Pendoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Jilid I-V. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Jendral Peternakan, Jakarta.
- Anonimus.** 2000. Penyediaan Vaksin di Indonesia Tahun 1999. Infovet, edisi 070, Bulan Mei Tahun 2005.
- Carter, G.R** 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *P. haemolytica*. Adv. Vet. Sci. 11:321-379.
- Cowan F. M and Steel's.** 1993. Manual for Identification of Medical Bacteria. Barrow GI and Feltham RKA (EDS). Cambridge University Press. Great Britain. Cambridge, 225-230.
- 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 Dis. 16:925-936.
- Jawetsz E., J. L. Melnick and E. A. Adelberg.** 1976. Principles of Diagnostic Medical Microbiology: Review of Medical Microbiology. 12 th Edition. Publication Lange Medical, California, 272-288.
- Kuhnert P., P. Boerlin, S. Emler and J. M. Krawinklerfrey.** 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* Subspecies and Molecular Identification of feline *Pasteurella multocida* subspecies septica by 16s rRNA gene sequencing. Int. J. Med. Microbiology, 290:599-604.
- Rimler. R.B. and K.R. Rhoades.** 1989. *Pasteurella multocida* : Pasteurella and Pasteurellosis. Academic Press. Horcouth Brace Javanovich Publisher. London, 131-160.
- Rimler R.B., K.B.Register, T. Magyar and M. R. Ackenann.** 1995. Influence of chondroitinase on direct hemagglutination titers and phagocytosis of *Pasteurella multocida* serogroup A, D and F. J Vet. Microbiol. 47:287-294.
- Setiawan. E.D. dan A. Sjamsudin.** 1988. Isolasi dan identifikasi *Pasteurella multocida* dari sapi Bali di Kupang, Nusa Tenggara Timur. Penyakit Hewan. 20:5-7.