

PATOGENESIS SEPTICAEMIA EPIZOOTICA (SE) PADA SAPI/KERBAU: GEJALA KLINIS, PERUBAHAN PATOLOGIS, REISOLASI, DETEKSI *PASTEURELLA MULTOCIDA* DENGAN MEDIA KULTUR DAN *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

ADIN PRIADI dan LILY NATALIA

Balai Penelitian Veteriner, Bogor
Jalan R. E. Martadinata 30, PO. Box 151, Bogor 16114. Indonesia

(Diterima dewan redaksi 3 November 1999)

ABSTRACT

ADIN PRIADI dan LILY NATALIA. 2000. Pathogenesis of Haemorrhagic Septicaemia (HS) in cattle and buffalo: clinical signs, pathological changes, reisolation and detection of *Pasteurella multocida* using culture medium and *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (1): 65-71.

In the study of the pathogenesis of Haemorrhagic Septicaemia (HS), one cattle and one buffalo were infected subcutaneously with a dose of 4×10^8 colony forming units of *Pasteurella multocida* B:2 in the neck region. The post infection clinical findings were observed. During this observation period, bacterial isolation was carried out from heparinised blood and nasal swabs. The buffalo succumbed 2 hours earlier than the cattle. The post mortem pathological changes in cattle and buffalo were similar but the lesions most severe in the buffalo. The prominent changes were observed in the lungs and bronchi of both animals. Bacterial reisolation and Polymerase Chain Reaction (PCR) for *P. multocida* were carried out from various samples kept at room temperature without any preservative for 15, 35 and 59 hours after the death of the animals. After 59 hours, heavily contaminated samples were found in all organs except bone marrow. Reisolation of *P. multocida* from these samples was difficult, however, the organism can still be identified by PCR to improve the viability of *Pasteurella multocida* and reducing the growth of contaminants, transport medium containing selective antibiotics was developed. Amikacin and Gentamicin were good selective antibiotics to suppress other contaminating organisms.

Key words: Pathogenesis, *Pasteurella multocida* B:2, cattle and buffalo, selective medium, PCR

ABSTRAK

ADIN PRIADI dan LILY NATALIA. 2000. Patogenesis Septicaemia Epizootica (SE) pada sapi dan kerbau: gejala klinis, perubahan patologis, reisolasi, deteksi *Pasteurella multocida* dengan media kultur dan *polymerase chain reaction* (PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (1): 65-71.

Pada pengamatan patogenesis *Septicaemia Epizootica*, seekor sapi dan seekor kerbau masing-masing diinfeksi dengan 4×10^8 colony forming units (CFU) kuman *Pasteurella multocida* B:2 secara *sub cutan* di daerah leher. Gejala klinis setelah infeksi diamati. Selama pengamatan, dilakukan isolasi bakteri dari darah yang berheparin dan usap kapas lidi dari hidung (*nasal swab*). Kerbau mati 2 jam lebih dahulu daripada sapi. Pada pemeriksaan *post mortem*, perubahan patologi pada sapi dan kerbau yang diinfeksi ternyata serupa tetapi lesi pada kerbau lebih parah dibandingkan pada sapi. Kelainan terutama terjadi pada paru-paru dan *bronchi*. Reisolasi bakteri dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk *P. multocida* B:2 dilakukan terhadap berbagai sampel yang disimpan pada suhu kamar tanpa pengawet pada waktu 15, 35 dan 59 jam setelah kematian hewan. Sesudah 59 jam, sampel dengan kontaminasi berat ditemukan hampir pada semua sampel kecuali sumbu tulang. Reisolasi *P. multocida* dari sampel seperti ini sulit dilakukan tetapi PCR masih dapat mendeteksi mikroorganisme tersebut. Untuk memperbaiki daya hidup *Pasteurella multocida* dan menekan pertumbuhan bakteri kontaminan, media transport yang mengandung antibiotik selektif telah dikembangkan. Amikacin dan gentamicin merupakan antibiotik selektif yang baik untuk menekan mikroorganisme kontaminan.

Kata kunci: Pathogenesis, *Pasteurella multocida* B:2, sapi dan kerbau, media selektif, PCR

PENDAHULUAN

Penyakit Septicaemia Epizootica (SE)/ Haemorrhagic Septicaemia (HS) atau disebut juga penyakit ngorok adalah penyakit yang menyerang hewan sapi atau kerbau, bersifat akut dengan mempunyai tingkat kematian yang tinggi. Kerugian

akibat penyakit ini cukup besar. WIRYOSUHANTO (1993) melaporkan bahwa kerugian ekonomi akibat penyakit ini pada sapi dan kerbau di Indonesia mencapai Rp 16,2 milyar pada tahun 1987. Penyakit ini tergolong dalam 14 jenis penyakit menular strategis yang koordinasi pengendaliannya dilakukan di tingkat pusat (DIREKTORAT BINA KESEHATAN HEWAN, 1995).

Walaupun demikian, spesimen yang dikirim dari kasus penyakit SE di Indonesia masih sangat sedikit yang sampai dilaboratorium diagnostik veteriner (GRAYDON *et al.*, 1993). Demikian juga tingkat keberhasilan isolasi bakteri penyebab penyakit tersebut masih sangat rendah. Isolasi bakteri sering mendapat kesulitan akibat kontaminasi sampel lapangan yang diterima (ACIAR REPORT, 1994).

Dalam penelitian ini dilakukan infeksi buatan dengan *P. multocida* B:2 penyebab SE dan diamati gejala klinis dan perubahan patologi yang terjadi pada hewan. Setelah kematian hewan, dipelajari tingkat keberhasilan isolasi bakteri dan deteksi mikroorganisme penyebab dari berbagai organ tubuh hewan dengan lama penyimpanan spesimen yang bervariasi sesuai dengan keadaan di lapangan pada umumnya. Pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui organ terbaik yang dapat dikirimkan ke laboratorium diagnostik guna menunjang keberhasilan isolasi dan teknik terbaik untuk isolasi dan deteksi bakteri penyebab untuk diagnosa penyakit SE.

Untuk menunjang keberhasilan isolasi bakteri beberapa telall bauyak media transport dikembangkan (DE ALWIS, 1973). Media-media tersebut adalah modifikasi dari media yang mula-mula dibuat oleh STUART (1946), untuk mentransportasikan gonococci yang mempunyai daya hidup yang buruk di luar tubuh manusia. Menurut STUART, media transport yang baik harus dapat mempertahankan keadaan bakteriologi dari spesimen, jadi tidak menyebabkan kematian atau juga perkembangbiakkan bakteri. Dalam penelitian ini dilakukan evaluasi dari beberapa media transport media yang sering digunakan, kemudian akan dikembangkan untuk membuat media transport selektif (dengan penambahan antibiotik tertentu) yang menunjang pertumbuhan *Pasteurella multocida* serta dapat menekan pertumbuhan bakteri kontaminan yang sering mengganggu usaha isolasi bakteri tersebut.

MATERI DAN METODE

Infeksi percobaan pada sapi dan kerbau

Untuk infeksi percobaan, *P. multocida* B:2 (332) ditumbuhkan dahulu semalam pada suhu 37°C pada lempeng agar darah domba, untuk kemudian dari koloni tunggal ditumbuhkan kembali pada *Brain Heart Infusion Broth* (BHI broth) dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Sebanyak 1 ml BHI broth yang telah diinkubasi tersebut ditumbuhkan kembali pada BHI broth yang baru, diletakkan dalam *shaking waterbath* yang bersuhu 37°C dan dibiarkan selama 3 jam dengan pemantauan densitas optikal untuk menentukan pertumbuhan yang optimal (densitas optikal: 0,3 pada panjang gelombang 620 nm). Jumlah kuman ditetapkan dengan perhitungan Colony Forming Unit (CFU) per

ml pada agar darah, menurut metoda MILES, MISRA dan IRWIN (1938)

Seekor sapi Bali dari seekor kerbau yang masing-masing berumur 2 talmn diinfeksi dengan menyuntikkan 1 ml kultur yang mengandung 4×10^8 CFU *P. multocida* B:2 (332), secara sub cutan di daerah leher. Sesudah penyuntikkan, hewan diamati setiap 4 jam sampai hewan mati. Pada tiap pengamatan, diambil sampel ulas kapas lidi dari hidung, darah dari vena jugularis dan kondisi/gejala klinis hewan seperti suhu tubuh juga dicatat. Terhadap hewan yang sudah mati dilakukan nekropsi dan diamati perubahan-perubahan patologis yang terjadi. Pada saat pemeriksaan *post mortem*, juga diambil berbagai sampel seperti paru-paru, limfoglandula prescapularis dan submandibularis, cairan oedema, tonsil, sumsum tulang, cairan pericardium, cairan ruang perut dan darah jantung. Sesudah pemeriksaan *post mortem*, bangkai hewan disimpan pada suhu kamar (tanpa pengawet) dan sampel serupa seperti di atas diambil kembali pada saat 15 jam setelah kematian hewan. Sampel berupa paru-paru, tonsil, sumsum tulang, limpa, darah jantung kembali diambil dari bangkai hewan pada waktu 35 dan 59 jam setelah kematian hewan.

Reisolasi bakteri dari deteksi *Pasteurella multocida* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Terhadap sampel ulas kapas lidi, darah (sewaktu hewan masih hidup) dan sampel organ tubuh setelah hewan mati dilakukan reisolasi *P. multocida*. Isolasi dari identifikasi *P. multocida* dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia menurut Cowan and Steel (COWAN, 1974).

Terhadap sampel yang sama juga dilakukan teknik PCR untuk deteksi *P. multocida* B:2. Satu set primers untuk mendeteksi *P. multocida* B:2 telah diidentifikasi di Victorian Institute of Animal Science (VIAS), Australia (BRICKELL *et al.*, 1998), digunakan pada penelitian ini. Amplifikasi dari DNA dilakukan dalam jumlah volume 20 µl. Campuran reaksi ini terdiri atas: 5 µM atau 1 µl masing-masing oligonukleotida, 2 mM atau 2 µl untuk masing-masing 4 deoksinukleosida triposfat (dNTP) (Pro mega), 2 U atau 0,5 fll. ensim Tth DNA polymerase (Pro mega), 10 x (2 µl) buffer PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl₂; 1,5 mM MgCl₂) dan sampel DNA yang dapat berupa cairan ulas kapas lidi, plasma, cairan tubuh dan lain-lain. Campuran tersebut ditutup dengan satu tetes minyak parafin dan kemudian dimasukkan dalam *thermal cycler* (Hybaid Omnigene) yang sudah diprogram dengan 35 siklus PCR, yaitu 30 detik pada 94°C, 30 detik pada 65°C, 30 detik pada 72°C. Sebanyak 12 µl dari basil amplifikasi tersebut kemudian diseparasi dalam 1% gel agarose yang diwarnai dengan ethidium bromida dan

fragmen DNA yang terjadi kemudian divisualisasikan dengan Ultra Violet *fluorescence* dan didokumentasi menggunakan kamera polaroid. Hasil PCR positif ditunjukkan oleh adanya *band* tunggal pada kira-kira 350 bp. Tidak adanya *band* tersebut menunjukkan sampel tersebut PCR negatif.

Media transport untuk *P. multocida*

Beberapa media transport yang biasa atau dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri dipersiapkan untuk dipakai menumbuhkan *P. multocida*. Media tersebut adalah:

1. Stuarts transport medium (Difco)
2. Amies Transport Medium (Gibco)
3. Brain heart Infusion broth (BHI broth/ Oxoid)
4. Semi-solid BHI broth (dengan penambahan 0,3 g agar/100 ml BHI broth)
5. Glycerol broth (37,5 g glycerol per 100 ml Luria broth (per liter: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl; pH 7,4)

Pengujian media tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut. *P. multocida* galur 332 mula-mula ditumbuhkan pada *BHI broth*, dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Ulas kapas lidi steril diteteskan 100 µl biakan *BHI broth* yang telah ditumbuhkan tadi dan dicampurkan dalam 900 µl peptone water. Setiap ulas kapas lidi tersebut ditumbuhkan pada media transport yang akan diuji secara duplo. Inkubasikan pada suhu tertentu (37°C dan suhu ruangan) selama 24 jam, 48 jam, 72 jam, 120 jam dan 168 jam. Setelah inkubasi, masukkan ulas kapas lidi tersebut dalam 5 ml PBS dan divortex. Terhadap cairan ini kemudian dilakukan penghitungan CFU/ml pada lempeng agar darah. Hasil penghitungan CFU dari berbagai media transport tersebut dicatat dan dibandingkan untuk dapat ditentukan media transport yang terbaik untuk pertumbuhan *P. multocida*.

Penambahan antibiotik pada media transport untuk menekan kontaminan

Bakteri yang diuji terhadap antibiotik adalah bakteri yang harus diperbaiki daya hidupnya (*Pasteurella multocida*), dan bakteri lain atau kontaminan yang harus ditekan pertumbuhannya (*Pasteurella haemolytica*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). Ke enam macam bakteri ini dicampur menjadi satu masing-masing dalam jumlah 102/µl dalam *peptone water* dan ditumbuhkan pada media transport BHI semisolid (agar miring) yang mengandung antibiotik dalam berbagai konsentrasi.

Berbagai antibiotik diuji tingkat konsentrasi hambat minimum (MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*) dalam media transport BHI dan dilakukan menurut FROST (1994). Antibiotik yang diuji adalah Ampicillin, Bacitracin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, dan Vancomycin dalam pengenceran 1/2 dari konsentrasi 0 hingga 100 µg/ml; Amikacin, Chlortetracyclin, Cycloheximide, Neomycin, Cloxacillin, Erythromycin, Gentamycin, Penicillin, Polymixin B dalam pengenceran 1/2 dari konsentrasi 0 sampai 25 µg/ml.

Pengujian dilakukan secara duplo. Pertumbuhan kuman yang diuji diamati setelah inkubasi pada suhu 30°C semalam. Kuman yang tumbuh pada BHI semi solid ini kemudian ditumbuhkan pada lempeng agar darah untuk dapat diidentifikasi. Kuman yang tidak tumbuh atau tumbuh dalam konsentrasi antibiotik tertentu dicatat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Infeksi *P. multocida* pada sapi dan kerbau

Setelah dilakukan penghitungan kandungan kuman *P. multocida* yang akan diinfeksi pada hewan, ternyata didapat 4 x 10⁸ CFU/ml kultur. Sebanyak 1 ml kultur disuntikkan secara subcutis pada hewan sapi maupun kerbau.

Gejala klinis setelah infeksi

Terlihat bahwa kerbau mengalami gejala yang lebih berat dibandingkan sapi. Suhu tubuh kerbau mencapai puncaknya pada 4 jam setelah infeksi, yaitu 43°C. Keadaan ini berbeda dengan pengamatan HORAGODA *et.al.* (1991) yang menyatakan kenaikan suhu hingga 41°C dicapai 12 jam sesudah infeksi. Hal ini mungkin karena rute infeksi yang berbeda yaitu diberikannya secara oral (HORAGODA *et. al.* 1991). Pada sapi suhu tubuh mencapai puncaknya 12 jam setelah infeksi, yaitu pada suhu 39,6°C. Gejala yang dapat diamati pada kerbau adalah kemerahan mata dan keluarnya cairan hidung. Sedangkan pada sapi yang terlihat hanya kulit yang memerah. Pembengkakan leher yang meluas dari tempat penyuntikkan sampai ke daerah sub mandibula terlihat pada sapi maupun kerbau pada 16 jam setelah infeksi. Kerbau mati pada 22 jam setelah infeksi sedangkan sapi mati 2 jam kemudian. Hasil pemantauan gejala klinis setelah infeksi dapat dilihat pada Tabel 1. Terlihat di sini kelainan yang terutama adalah gangguan pernafasan yang disertai demam dan kelemahan tubuh.

Tabel 1. Perubahan yang terjadi setelah infeksi sampai kematian hewan

Waktu pasca infeksi	Kerbau		Sapi	
	Suhu tubuh	Gejala klinis	Suhu tubuh	Gejala klinis
0 jam	39,1 °C	normal	39,0°C	Normal
4 jam	43,0 °C	Mata kemerahan	39,0°C	Normal
8 jam	43,0 °C	Ekskresi cairan hidung Mata merah, cairan Hidung makin jelas	39,0°C	mata merah
12 jam	39,0 °C	Gejala di atas makin Parah	39,6°C	mata merah
16 jam	39,6 °C	Pembengkakan leher	39,6°C	Ekskresi hidung Pembengkakan leher
20 jam	39,6 °C	Gejala makin jelas	40,0°C	makin leso
22 jam	-	hewan mati	39,4°C	Hewan jatuh/kejang
24 jam	-	-	-	Hewan mati

Perubahan patologi

Lesi yang ditemukan pada kerbau lebih parah dibandingkan pada sapi. Terdapat oedema sub eutan yang meluas di daerah penyuntikkan (daerah leher). Jaringan otot dibawahnya pucat dan *oedematous*. Oedema juga meluas ke bawah ke daerah bahu, juga ke alas ke daerah sub mandibula. Limfoglandula presepulla dan sub mandibula terlihat membengkak dan *oedematous*. Pada paru-paru terlihat adanya pembendungan dan busa terlihat banyak terdapat di bronchus dan saluran udara lainnya. terlihat juga perdarahan titik (*ecchymotic*) pada permukaan *epicardial* dan *endocardial*. Pada saluran pemapasan bagian atas dan tonsil juga terlihat adanya perdarahan *petechiae*. Secara umum dapat dilihat bahwa perubahan yang menyolok berupa *oedema subcutan* yang meluas sampai perubahan pada paru-paru yang berupa pembendungan/pneumonia. Hal serupa juga ditemukan oleh DE ALWIS (1991) dan GRAYDON *et al* (1993)

Dari hasil pemeriksaan patologis ini dapat terlihat bahwa kerbau lebih peka terhadap infeksi *P. multocida* dibanding sapi. DE ALWIS (1991); MARERO (1991); RAHIM (1991) juga telah mendapatkan kenyataan yang serupa di lapangan.

Reisolasi dan deteksi *P. multocida* dengan PCR

Reisolasi kuman dari darah dari hewan terinfeksi menunjukkan bahwa bakteremia didekati 12 jam setelah infeksi baik pada sapi maupun kerbau. Pada ulas kapas lidi, *P. multocida* hanya ditemukan pada sampel dari kerbau. Biakan untuk *P. multocida* dapat diisolasi dari semua sampel darah sejak 12 jam pasca infeksi sampai pada saat kematian hewan. Pada sampel ulas

kapas lidi, pada kerbau *P. multocida* dapat ditemukan saat 12 jam pasca infeksi, sedangkan pada sapi dapat ditemukan 16 jam pasca infeksi. Terlihat bahwa perjalanan kuman lebih cepat pada kerbau dibandingkan pada sapi. Kontaminasi yang terjadi pada sampel ulas kapas lidi ditemukan pada 4 jam dan 24 jam setelah infeksi mungkin disebabkan rendahnya jumlah *P. multocida* pada jam ke 4 dan menurunnya jumlah kuman ini pada jam ke 24. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada Tabel 3. dapat dilihat hasil reisolasi bakteri dan PCR untuk mendeteksi *P. multocida*. Saat 15 jam setelah kematian hewan, *P. multocida* dapat diperoleh dalam kultur murni dari semua sampel yang diambil sewaktu nekropsis, kecuali satu sampel paru-paru sapi yang terkontaminasi. Untuk sampel yang dikoleksi pada 35 dan 59 jam setelah kematian hewan, isolasi bakteri sudah sulit dilakukan karena adanya kontaminasi yang cukup berat. Kontaminan yang ditemukan umumnya adalah *E. coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Streptococcus* sp. Meskipun demikian dengan cara pengenceran sampel secara seri (kelipatan 10), kadang-kadang *P. multocida* masih dapat dimungkinkan untuk dapat diisolasi dari paru-paru pada 35 jam dan 59 jam pasca infeksi. Sedangkan PCR dapat menunjukkan hasil positif dari sampel limpa dan paru-paru 59 jam sesudah kematian. Hasil PCR positif spesifik terhadap *P. multocida* B:2 yang ditunjukkan oleh adanya band tunggal pada 350 bp dapat dilihat pada Gambar 1. Dari hasil itu dapat dilihat keunggulan teknik PCR yang dapat mendeteksi *P. multocida* dalam keadaan sampel yang terkontaminasi berat. Teknik PCR yang digunakan telah diuji kemampuannya untuk mendeteksi *P. multocida* B:2 dalam sampel yang terkontaminasi bakteri lain (NATALIA, 1996).

Tabel 2. Hasil Reisolasi *P. multocida* setelah infeksi sampai kematian hewanLama

Pasca infeksi	Hewan	Jenis sampel		
		Darah berheparin	Ulas kapas lidi	Cairan oedem
0 jam	Sapi	TD	TD	TD
	Kerbau	TD	TD	TD
4 jam	Sapi	Negatif	Kontaminasi	TD
	Kerbau	Negatif	Kontaminasi	TD
12 jam	Sapi	3×10^3 CFU/ml	Negatif	TD
	Kerbau	$8,5 \times 10^4$ CFU/ml	1×10^2 CFU/ml	TD
16 jam	Sapi	$2,4 \times 10^4$ CFU/ml	6×10^3 CFU/ml	TD
	Kerbau	6×10^4 CFU/ml	$1,1 \times 10^4$ CFU/ml	TD
20 jam	Sapi	$4,2 \times 10^5$ CFU/ml	6×10^2 CFU/ml	TD
	Kerbau	$4,0 \times 10^7$ CFU/ml	5×10^4 CFU/ml	TD
22 jam	Kerbau	$4,9 \times 10^9$ CFU/ml	Kontaminasi	$1,6 \times 10^9$ CFU/ml
24 jam	Sapi	$7,5 \times 10^6$ CFU/ml	Kontaminasi	$2,4 \times 10^4$ CFU/ml

Tabel 3. Reisolasi kuman *Pasteurella multocida* dan reaksis PCR 15 jam, 35 jam dan 59 jam sesudah kematian sapi dan kerbau

Organ/Cairan		Sesudah kematian					
		15 jam		35 jam		59 jam	
		Isolasi	PCR	Isolasi	PCR	Isolasi	PCR
L.g.Presacpularis	s	8×10^9	TD	TD	TD	TD	TD
	K	$2,3 \times 10^{10}$	TD	TD	TD	TD	TD
L.g. Submaxillaris	s	$1,3 \times 10^9$	TD	TD	TD	TD	TD
	K	6×10^9	TD	TD	TD	TD	TD
Tonsil	s	TD	-	TD	-	Kont	TD
	K	$3,4 \times 10^{10}$	-	Kont	-	Kont	-
Sumsum	s	$1,9 \times 10^9$	-	Kont	TD	2×10^9	-
	K	$2,5 \times 10^{10}$	-	6×10^9	TD	Kont	-
Limpa	s	8×10^9	+	Kont	TD	Kont	+
	K	2×10^{10}	+	Kont	TD	Kont	+
Paru-paru	s	1×10^{10}	+	Kont	TD	Kont	-
	K	$2,5 \times 10^9$	+	1×10^{10}	TD	Kont	+
Darah jantung	s	5×10^{10}	+	Kont	-	Kont	-
	K	$1,6 \times 10^{11}$	+	Kont	+	Kont	-
Cairan pericardium	s	TD	TD	TD	TD	TD	TD
	K	$2,7 \times 10^{10}$	+	TD	TD	TD	TD
Cairan oedem	s	$6,3 \times 10^{10}$	TD	TD	TD	TD	TD
	K	$4,5 \times 10^{10}$	TD	TD	TD	TD	TD
Cairan abdominal	s	TD	TD	TD	TD	TD	TD
	K	$2,5 \times 10^{10}$	TD	TD	TD	TD	TD

S = sapi
 Kont = Kontaminasi
 = + reaksi PCR positif

K = kerbau
 td = Tidak dilakukan
 - = reaksis PCR negatif

Tabel 4. Hasil pemantauan pertumbuhan *P. multocida* pada berbagai media transport

Media	Suhu	0 jam *	24 jam*	48 jam*	72 jam*	120 jam*	168 jam*
Stuart	suhu ruang	31. 10 ⁴	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Amies	suhu ruang	31. 10 ⁴	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
BHI	suhu ruang	31. 10 ⁴	166.10 ⁶	167. 10 ⁶	50. 10 ⁶	86. . 10 ⁴	57. 10 ⁴
BHI	37°C	31. 10 ⁴	229. 10 ⁶	0,03. 10 ⁶	A	0	0
BHI semi	suhu ruang	31. 10 ⁴	99. 10 ⁶	1,3. 10 ⁶	1,9. 10 ⁶	14,9. 10 ⁴	51. 10 ⁴
BHIsemi	37°C	31. 10 ⁴	13. 10 ⁶	0,6. 10 ⁶	0,24. 10 ⁶	12,1. 10 ⁴	7,1. 10 ⁴
Gly broth	37°C	31. 10 ⁴	-	195.103	155	225	<100

*: cfu/ulas kapas lidi dalam 1 mlPBS

Media transport untuk *P. multocida*

Hasil selengkapnya dari pengujian media transport dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 1. Untuk media Amies dan Stuart, *P. multocida* mengalami kematian dalam waktu 24 jam setelah inkubasi. Pada media BHI, *P. multocida* mengalami kematian setelah 72 jam inkubasi pada suhu 37°C. Jadi media Stuart, Amies dan BHI ini tidak dapat digunakan sebagai media transport. Untuk media *Glycerol broth*, pertumbuhan *P. multocida* tidak sebaik pertumbuhan pada media BID semi solid. Dari hasil yang didapat, media BHI semi solid merupakan media transport yang terbaik (*P. multocida* dapat tumbuh dengan baik pada suhu ruang ataupun pada suhu 37°C walaupun sampai hari ke tujuh atau 168 jam).

Penambahan antibiotik pada media transport untuk menekan kontaminan

Hasil pengujian berbagai antibiotik pada media transport dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3. Terlihat bahwa Amikacin dan Gentamicin merupakan antibiotik yang dapat ditambahkan pada media transport untuk menekan bakteri kontaminan (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pasteurella hemolytica*). Amikacin dapat digunakan 4 µg/ml dan Gentamicin dapat digunakan 51-lg/ml untuk menekan bakteri kontaminan tanpa mengganggu pertumbuhan *P. Multocida* sendiri. Gentamicin dan Amphotericin B telah dipakai oleh MOORE *et al.* (1994).dalam media lempeng agar darah selektif untuk *P. multocida*. Dinyatakannya bahwa Amikacin dan Gentamicin (dari kelompok antibiotik aminoglycoside), mempunyai nilai hambat bakteri yang konsisten dan efektif untuk menghambat penyebaran *Proteus mirabilis* yang sering menyulitkan isolasi *P. multocida*. Amphotericin B digunakan sebagai fungisida dengan tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Selain itu untuk menghambat pertumbuhan ragi atau cendawan, media dapat ditambahkan amphotericin B sebesar 4 µl/ml (ACIAR REPORT, 1994).

KESIMPULAN

Dari hasil pengamatan di atas dapat disimpulkan bahwa kerbau lebih peka terhadap Septicaemia Epizootica dibandingkan sapi. Gejala penyakit yang menyolok adalah demam yang disertai gangguan pernafasan dan kebengkakan daerah leher yang meluas ke atas dan ke daerah dada. Bakteriemia pada sapi dan kerbau terjadi pada 12 jam pasca infeksi, dan bakteri dapat ditemukan di cairan hidung kerbau pada saat yang sama tetapi pada sapi 4 jam sesudahnya. Perubahan patologi yang menonjol adalah oedema yang meluas di daerah leber, pembendungan paru-paru/pneumonia, dan adanya perdarahan petechiae pada saluran pernafasan bagian atas.

1. pGEM *positive markers*
2. PCR product dari *P. multocida* B:2 (HS) - positif(350 bp)
3. Kontrol negatif untuk PCR *P. multocida* B:2
4. dan 5. PCR product dari *P. multocida* (non-HS)

Gambar 1. Reaksi positif PCR *Pasteurella multocida* B:2 (HS) dan *P. multocida* (Non-HS)

Reisolasi *P. multocida* masih dapat dilakukan pada sampel yang diambil 35 jam setelah kematian hewan. Tetapi sesudah itu, adanya kontaminasi oleh bakteri kontaminan (terutama *Proteus* sp.) sangat menyulitkan usaha isolasi. Dalam hal ini sampel sumsum tulang merupakan sampel terbaik, karena dari sampel ini masih dapat dilakukan isolasi bakteri penyebab. Meskipun sampel telah berumur lama (lebih dari 3 hari), teknik PCR masih dapat mendeteksi bakteri penyebab. Untuk menunjang keberhasilan diagnosa dan isolasi *P. multocida*, dapat digunakan media transport BHI semi solid dengan penambahan Amikacin 4 µg /ml; Gentamicin: 5 µg/ml, dan Amphotericin B 4 µg /ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih terutama ditujukan pada Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) yang telah membantu terlaksananya penelitian ini. Kepada Dr. Phillip Wielders dan Ms. Simone Warner dari Victorian Institute of Animal Science, Australia juga kami ucapkan terima kasih atas segala bantuan dan saran-sarannya. Kepada M. Syafarudin yang telah membantu pekerjaan di laboratorium tidak lupa kami ucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- ACIAR. 1994. Annual Report. Diagnosis and Control of Haemorrhagic Septicaemia in Indonesia. ACIAR Project No. 9202.
- BRICKELL, S. K., L.M. THOMAS, K.A. LONG, M. P. ANACCIO, and P.R. WIDDERS. 1998. Development of a PCR test based on a gene region associated with the Pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2 the Causal Agent of Haemorrhagic Septicaemia in Asia. *Vet. Microbiol.* 59(4):294-307.
- COWAN, S.T. 1974. Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge.
- DE ALWIS, MC.L. 1973. Bacteriological changes in specimens during transport. *Ceylon Vet.* 1. 21(1-2):2-6
- DE ALWIS, M.C.L. 1991. Haemorrhagic Septicaemia - A Review of the present status. Proceedings of the fourth International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia. FAO, Bangkok, Thailand. 11-15 Feb. 1991.
- DIREKTORAT BINA KESEHATAN HEWAN. 1995. Kebijakan Pemberantasan dan Pengendalian Penyakit Ngorok di Indonesia. Rapat Evaluasi Pemberantasan Penyakit SE di Wilayah BPPH Wilayah VI dan Evaluasi Protek ACIAR, Denpasar, 28 Agustus 1995.
- FROST, I.A 1994. Testing for Resistance to Antimicrobial Drugs. In Methods in Practical Laboratory Bacteriology. Edited by Henrik Chart. CRC Press. Inc.
- GRAYDON, R. I.; B.E. PATTEN and H. HAMID. 1993. The Pathology of Experimental Haemorrhagic Septicaemia in Cattle and Buffalo. *Pasteurellosis in Production Animals.* ACIAR Proceedings no. 43.
- HORADAGODA, N.U., M.C.L. DE ALWIS, T.G. WIJewardana, K. BELAK, A.U. GOMIS, and A.A. 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
- MILES, A. A., S.S. MISRA, and I. O. IRWIN. 1938. The Estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hyg. Camb.* 38:732.
- MOORE, M.K., L.C. CHUBBS and R.I. GATES. 1994. A New Selective Enrichment Procedure for Isolating *Pasteurella multocida* from Avian and Environment Samples. *Avian Dis.* 38:517-524.
- MORERO, R.F. 1991. Status Report- Philippines. Proceedings of the fourth International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia. FAO, Bangkok, Thailand. 11-15 Feb. 1991.
- NATALIA, I. 1996. Abattoir survey for *P. multocida* B:2 in Indonesia using conventional and PCR technology. International Workshop on Diagnosis and Control of Haemorrhagic Septicaemia. Denpasar, Bali 28-30 May 1996.
- STUART, R.D. 1946. Diagnosis and Control of Gonorrhoea by Bacterial Culture with a Preliminary Report on a New Method of Transporting Clinical Specimens. *Glasg. Med. J.* 27:131.
- RAHIM, N.A.A. 1991. Status Report- Malaysia. Proceedings of the fourth International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia. FAO, Bangkok, Thailand. 11-15 Feb. 1991.
- WIRYOSUHANTO, S.D. 1993. Sistem kesehatan Hewan dalam Era Tingkat Landas. Rapat Konsultasi Teknis Nasional Direktorat Jendral Peternakan, Cisarua, 5-8 Januari 1993 hlm. 20.