

Identifikasi Molekuler *Pasteurella multocida* Penyebab *Pasteurellosis* Pada Babi Di Yogyakarta

(Molecular Identification Of Pasteurella multocida As Causal Of Pasteurellosis Of Swine In Yogyakarta)

Victor Lenda, Hermilinda Parera
Laboratorium Anatomi dan Patologi,
Program Studi Kesehatan Hewan, Politeknik Pertanian Negeri Kupang,
Jln. Adisucipto Penfui Kupang, E-mail: victor.lenda@yahoo.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the genetic variation of *P. multocida* in Yogyakarta with other overseas *P. multocida* strains. Samples were obtained from necropted intensive pig farming with clinically pneumonia symptoms, specific pulmonary lesions and then followed by histopathological examination and biochemical characterization of the isolates. Then followed by histopathological examination and biochemical characterization of the isolates. Molecular test performed by DNA extraction using the QIAGEN QIAamp DNA minikit, amplification of the 16S rRNA gene using forward primer 5'-GGA GTG AAC TGC AGC TAA TAC C-3', and reverse primer 5'-GTA GGT AAG CTT CGC GTT GTT G-3', electrophoresis, purification and sequencing. Macroscopic and histopathological examination results were analyzed descriptively. Sequencing results were analyzed by *multiple alignment* with other *Pasteurella spp.* taken from *GenBank* using the *Clustal W* software, subsequently analyzed using *Neighbour-Joining* and *Maximum Parsimony* method that exist in program MEGA version 5.1. The results showed genetic distance based on 765 nucleotides of 16S rRNA gene of *P. multocida* isolates from lungs of *bronchopneumonia* of swine in Yogyakarta at 0%. Filogram based on the nucleotide sequence showed a high similarity between *P. multocida* isolates from Yogyakarta and other isolates from USA, Germany, China, Europe, and Hungaria.

Keywords: *Pasteurella multocida*, *bronchopneumonia*, pigs, 16S rRNA gene, phylogenetic

PENDAHULUAN

Pneumonia pasteurellosis merupakan penyakit yang penting dan memerlukan biaya yang tinggi dalam penanganannya. *Pasteurella multocida* merupakan spesies penting yang patut diduga penyebab proses penyakit ini. Saat ini, metode yang terutama digunakan untuk melakukan diferensiasi adalah berdasarkan keragaman tipe kapsular dan somatik (Pijoan, 1983).

Analisis molekular berkaitan dengan keragaman genetik dan filogenetik dapat memberikan kontribusi yang sangat baik terhadap pemetaan (*mapping*) penyebab *pasteurellosis* pada tingkatan genomik. Metode PCR dapat menjadi alat diagnostik yang berguna untuk deteksi dan karakterisasi serta penentuan sub tipe *P. multocida* dan mampu menunjukkan keterkaitan

antara isolat. Menurut Townsend *et al.* (1998), metode PCR memberikan hasil yang lebih cepat, praktis dan terukur dalam penentuan prevalensi dan hubungan genetik dari serotipe penyebab SH (*P. multocida* tipe B:2, B:5, dan B:2,5) dengan *pasteurella septicaemia* akut pada babi. Metode tersebut juga menerangkan adanya hubungan epidemiologis antara isolat *P. multocida* tipe B:2 asal sapi dan babi dengan sistem biotiping Blackall seperti yang terdapat dalam Blackall *et al.* (1997).

Metode PCR dengan menggunakan gen 16S rRNA terhadap isolat *P. multocida* yang berasal dari beberapa spesies ternak (kerbau, sapi, babi, kambing dan domba) yang dilakukan oleh Dey *at al.* (2007) menunjukkan isolat asal sapi, babi dan kambing memiliki tingkat homologi yang tinggi (99,9%) dengan isolat asal kerbau. Hal ini juga menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara isolat *P. multocida* serotype B:2 (agen utama penyebab SH) pada sapi dan kerbau dengan isolat asal spesies ternak lainnya, termasuk kemungkinan adanya transmisi mikroorganisme antar spesies ternak.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan analisis molekuler dengan metode PCR dan mengetahui variasi genetic antar isolat *P. multocida* di Yogyakarta serta hubungan kekerabatan dengan beberapa isolat *P. multocida* luar negeri.

METODE PENELITIAN

Sampel isolat *P. multocida* berasal dari babi (*Sus scrofa*) diperoleh dari peternakan yang terdapat di kabupaten Sleman dan Bantul, Propinsi DIY, dengan gejala klinis gangguan respirasi seperti kesulitan bernapas, dan adanya eksudat mukopurulen dari hidung, serta menunjukkan lesi berupa hepatitisasi kelabu.

Identifikasi dan Karakterisasi Biokimia *P. multocida*

Pemeriksaan mikrobiologi dilakukan kultur mikroorganisme dari lesi pulmo pada media agar darah (PAD). Identifikasi koloni dan sel bakteri *P. multocida* Kultur murni *P. multocida* hasil identifikasi dan karakterisasi biokimiawi kemudian disimpan di dalam tabung reaksi pada 4°C (Quinn *et al.*, 2003; MacFaddin, 1980).

Isolasi, Amplifikasi Gen 16S r RNA, Elektroforesis dan Sequensing DNA

Isolasi DNA isolat *P. multocida* menggunakan Qiagen® kit. Hasil isolasi DNA digunakan untuk cetakan pada proses amplifikasi dengan metode PCR. Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR dirancang dengan menggunakan *software* Primer3Plus. Pengujian spesifisitas primer dilakukan dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer dengan *forward primer* 5'-GTG GGA AAC TGC AGC TAA TAC C-3', dengan *melting temperature* (Tm) 63,7°C, sedangkan *reverse primer* 5'-GTA GGT AAG GTT CTT CGC GTT G-3', dengan Tm 63,2°C. Kedua primer memiliki panjang nukleotida 22 nukleotida dengan produk amplifikasi sebesar 832 bp. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dalam kondisi berikut: *pre denaturasi* (suhu 95°C selama 3 menit); *denaturasi* (suhu 95°C selama 30 detik); *annealing* (suhu 55°C selama 30 detik); *elongation* (suhu 72°C selama 30detik); *post elongation* (suhu 72°C selama 5 menit). Reaksi dilakukan sebanyak sebanyak 26 siklus. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis. Hasil PCR yang akan digunakan untuk reaksi sekuensing dipurifikasi terlebih dahulu.

Analisis data

Hasil sekuensing dianalisis dengan bantuan program MEGA 5.1. (Tamura *et al.*, 2011). *Multiple alignment* dengan *clustal W* terhadap data sekuensing dilakukan untuk mendapatkan nilai homologi, nilai perbedaan dan gambaran kekerabatan (Higgins *et al.*, 1994). Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbour-Joining* dan *Maximum Parsimony* dengan 1000 kali pengulangan menurut parameter model Kimura-2 (Saito and Nei, 1987). Urutan basa nukleotida dari spesies *P. multocida* lain yang digunakan untuk pembandingan berasal dari *National Center for Biotechnology Information* (*ncbi/www.ncbi.nlm.gov*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

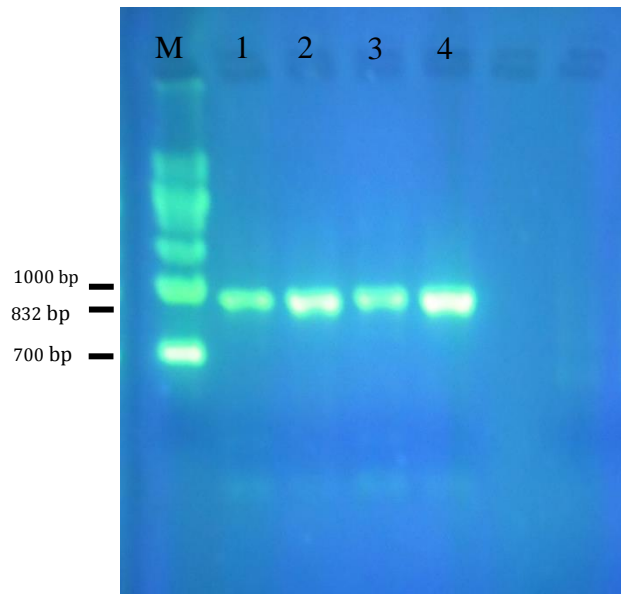
Hasil pemeriksaan terhadap sampel pulmo babi lesi berwarna pink hingga merah gelap akibat kongesti dan hemoragi. Lesi menciri *bronchopneumonia* teramati, berupa konsolidasi anteroventral pulmo dan hepatitis kelabu. Bidang irisan pulmo menunjukkan adanya eksudasi serous disertai atau tanpa adanya perdarahan.. Beberapa peneliti juga menyatakan bahwa lesi yang berhubungan dengan *P. multocida* menciri dengan adanya proses eksudasi ke dalam *bronchi* and *bronchioles*, serta nekrosis jaringan pulmo (Mackie *et al.*, 1992, Cameron *et al.*, 1996; Pijoan, 2006; Pors *et al.*, 2011). Selanjutnya Kumar (2007) menyatakan bahwa edema pulmonum, kongesti dan hemoragi dengan eksudasi yang menutup *bronchus* dan *bronchiolus* seringkali terjadi. Peran penting *P. multocida* dalam menyebabkan pneumonia pada babi menciri dengan *bronchopneumonia* fibrinosa (pleuropneumonia) daerah *cranioventral* pulmo, dan seringkali berkaitan dengan infeksi virus influenza dan stress yang berkaitan dengan manajemen pemeliharaan yang jelek, seperti ventilasi yang buruk dan tingginya kadar amoniak dalam udara (Lopez, 2001).

Isolasi, Identifikasi dan Uji Biokimiawi

Hasil isolasi, identifikasi dan uji biokimiawi terhadap sampel pulmo menunjukkan bakteri dapat tumbuh pada media agar darah, bentuk koloni sirkuler, konveks dan non hemolitik. Morfologi sel *coccobacillus* bipolar. Bakteri tidak mampu tumbuh pada media MCA. Uji biokimia untuk mengetahui kemampuan fermentasi laktosa negatif (-), sukrosa positif (+), maltosa negatif (-) dan glukosa positif (+). Oleh karena itu, dari hasil identifikasi dan uji biokimiawi dapat disimpulkan bahwa bakteri yang terisolasi dari sampel adalah benar *P. multocida* (MacFaddin, 1980).

Amplifikasi dan Hubungan Kekerabatan Berdasarkan Urutan Nukleotida Gen 16S rRNA

Hasil isolasi DNA kultur murni *P. multocida* dianalisis dengan teknik PCR pada gen 16S rRNA berhasil mengamplifikasi gen 16S rRNA, seperti terlihat jelas pada gel agarose *band* dengan berat molekul DNA isolat kira-kira sebesar 832 bp (**Gambar 1**). Selanjutnya produk PCR dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan nukleotida dari gen 16S rRNA.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA *P. multocida* isolat Yogyakarta

Penjajaran berganda urutan nukleotida gen 16S rRNA pada isolat *P. multocida* hasil penelitian dengan *P. multocida* dan beberapa spesies *P. multocida* asal beberapa negara (*GenBank*) yang digunakan sebagai pembandingan menunjukkan tidak terdapat adanya perbedaan nukleotida.

Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida (765 nukleotida) gen 16S rRNA dengan program MEGA 5.05

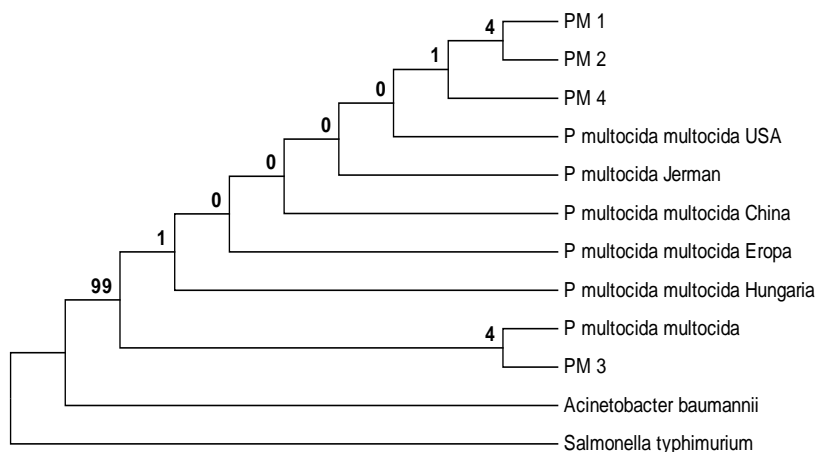
Nama	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P.m. multocida</i>												
<i>P.m. Jerman</i>	0.0 00											
<i>P.m. multocida USA</i>	0.0 00	0.0 00										
<i>P.m. multocida China</i>	0.0 00	0.0 00	0.0 00									
<i>P.m. multocida Eropa</i>	0.0 00	0.0 00	0.0 00	0.0 00								
<i>P.m. multocida Hungaria</i>	0.0 00	0.0 00	0.0 00	0.0 00	0.0 00							

<i>PM 1</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>PM 2</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>PM 3</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>PM 4</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>A. baumannii</i>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93
<i>S. typhimurium</i>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	54

Keterangan: 1. *P. m. multocida* (genBank); 2. *P. m. Jerman*; 3. *P. m. USA*; 4. *P. m. China*; 5. *P. m. Eropa*; 6. *P. m. Hungaria*; 7. *PM1* 8. *PM2*; 9. *PM3*; 10. *PM4*; 11. *A. baumannii*; 12. *S. typhimurium*

Jarak genetik yang dihitung menggunakan model 2 parameter Kimura (Tabel 1) menunjukkan tidak terdapat perbedaan jarak genetik antara isolat *P. multocida* asal Yogyakarta dengan *P. multocida* (GenBank) dan beberapa *P. multocida* asal beberapa negara di dunia. Nilai rata-rata jarak genetik antar isolat penelitian sebesar 0%. Analisis terhadap hubungan kekerabatan antar spesies *P. multocida* menggunakan metode *Neighbor joining* terhadap 765 basa nukleotida penyusun gen 16S rRNA menunjukkan bahwa pada tingkatan nukleotida isolat *P. multocida* hasil penelitian memiliki kedekatan yang sangat kuat (*high similarity*) dengan isolat pembandingan lain yang berasal dari beberapa negara, diantaranya isolat *P. multocida* Jerman, USA, China, Eropa dan Hungaria.

Filogram metode *Maximum Parsimony* menggunakan spesies *Acetobacter baumannii* dan *Salmonella typhimurium* sebagai *uotgroup*. Isolat *P. multocida* yang diperoleh terbagi dalam dua sub cabang utama, yaitu sub cabang I, terdiri dari isolat *PM 1*, *PM2* dan *PM4* bersama dengan isolat *PM. Jerman*, *PM USA*, *PM China*, *PM Eropa*, dan *PM Hungaria*, sedangkan sub cabang II terdiri dari isolat *PM3* dan *P. multocida multocida*, Uji validitas konstruksi filogenetik dengan *bootstrap* 1000 kali juga menunjukkan isolat *PM1* dan *PM2* berada dalam percabangan yang sama, hal ini berarti kedua isolat tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang sangat kuat (**Gambar 2**)



Gambar 2. Filogram menggunakan metode *Maximum Parsimony* dengan *bootstrap* 1000 kali dari nukleotida gen 16S rRNA (765 nt) spesies *P. multocida* isolat Yogyakarta dengan beberapa spesies *P. multocida* lain

Walaupun demikian, semua *P. multocida* ini menunjukkan kekerabatan yang tinggi dilihat dari jarak genetiknya yaitu 0%. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan Davies (2004) bahwa adanya kesamaan yang tinggi (*high similarity*) dalam urutan sekuen nukleotida gen 16S rRNA *P. multocida* yang berasal dari spesies yang sama akan memberikan nilai *bootstrap* yang tinggi dalam analisis kekerabatannya. Penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa rerata perbedaan urutan gen 16S rRNA isolat *P. multocida* dari yang paling tinggi hingga paling rendah berturut-turut adalah isolat asal unggas, sapi, domba dan babi.

Dari hasil penelitian dan analisis dapat disimpulkan bahwa :1) *P. multocida* merupakan salah satu penyebab *bronchopneumonia* pada babi di Yogyakarta; 2) Hasil sekuensing gen 16S rRNA menguatkan hasil identifikasi *P. multocida* asal pulmo babi penderita *bronchopneumonia* Yogyakarta; 3) Isolat *P. multocida* asal Yogyakarta mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat erat dengan beberapa isolat *P. multocida* asal luar negeri diantaranya isolat Jerman, USA, China, Eropa dan Hungaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R., 1997. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet. Microbiol.* 57:355-360.
- Cameron, R.D., O'Boyle, D., Frost A.J., Gordon A.N., and Fegan, N., 1996. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp *gallicida* in large pig herd. *Aust. Vet. J.*, 73:27-29.

- Davies, R. L., MacCorquodale, R., Baillie, S. and Caffrey B., 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.* 52:59–67.
- Davies, R. L., 2004. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gen. *Microbiology.* 150: 4199–421.
- Dey, S., Singh, V.P., Kumar, A.A., Sharma, B., Srivastava, S.K., Singh, N., 2007. Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* serogroup B isolates from different animal species. *Veterinary Science* 83:1-4.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Jamaludin, R., Blackall, P.J., Hansen, M.F., Humphrey, S., Styles, M., 2005. Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 53, 203-20;
- Kumar, H., Mahajan, V., Sharma, S., Alka, Singh R., Arora, A. K., Banga, H. S., Verma, S., Kaur, K., Kaur, P., Meenakshi, Sandhu, K. S., 2007. Concurrent pasteurellosis and classical swine fever in Indian pigs. *Journal of Swine Health and Production.* 15(5):279-283.
- Lopez, A. 2001. Respiratory System, Thoracic Cavity and Pleura. In: *Thomson's Special Veterinary Pathology*, 3rd Ed. McGavin, M. D., Carlton W. W. & Zachary, J., (eds.), Mosby-Year Book Inc., Pp. 125-195.
- Mackie, J.T., Barton M., and Kettlewell, J., 1992. *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. *Aust. Vet. J.* (69) Pp. 227–228.
- MacFaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 527
- Pijoan, C., 2006. Pneumonic pasteurellosis. In: *Diseases of Swine*, 9th ed. (Eds.) Straw B. *et al.* Ames, IA: Iowa State University Press. Blackwell Publishing Australia. Pp. 719-725.
- Pors, S. E., Hansen M. S., Bisgaard, M., Jensen, H. E., 2011. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* 150 (1-2):160-166.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., Fitzpatrick, E.S., 2003. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* 2nd Ed. John Wiley & Sons, Iowa. Pp. 137-143.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4:406-425.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

- Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J., 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1096-1100.
- Townsend, K.M., O'Boyle, D., Phan, T.T., Hanh, T.X., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Trung, N.T., Frost, A.J., 1998b. Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.* 63:205-215.