

Restriksi Endonuklease DNA Genomik *Pasteurella multocida* Isolat Indonesia, Galur Katha dan Galur Referen yang Dianalisa dengan PFGE

SUPAR

Balai Penelitian Veteriner, PO BOX 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 23 September 2003)

ABSTRACT

SUPAR. 2003. Genomic DNA restriction endonuclease from *Pasteurella multocida* isolated from Indonesia, katha strain and reference strains and analysed by PFGE. *JITV* 8(3): 196-204.

Pasteurella multocida strains are the causative disease agents of wide range of domestic and wild animals in Indonesia. The most important serotypes are associated with *Haemorrhagic septicaemic* (HS) diseases in cattle and buffaloes, cholera in ducks and chickens. The HS disease associated with *P. multocida* in large ruminants in Indonesia is controlled by killed whole cell vaccines produced by the use of *P. multocida* Katha strains. There is no discriminatory data of the molecular biology technique has been applied to investigate *P. multocida* isolates from different geographic locations in Indonesia. The purpose of this studies were to observe the genetic diversity among *P. multocida* isolated from various geographic locations and compared with Katha vaccine strain and other reference strains. A total samples of 38 isolates and strains of *P. multocida* were analysed by means of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Each sample was grown in nutrient broth, cells were separated by centrifugation. Whole cell pellet was mixed with agarose and then prepared agarose plugs. The genomic DNA of each sample was digested *in situ* (plug) with either restriction endonuclease of *Apal* and/or *BamHI*. The digested genomic DNA of each sample was analysed by PFGE, the genomic DNA restricted profile of each sample was compared with others. The use of *Apal* restriction endonuclease digestion and analysed by PFGE, demonstrated that 34 out of 38 *P. multocida* samples could be differentiated into 16 *Apal* types, whereas based on the *BamHI* digestion of these samples were differentiated into 20 *BamHI* types. Genomic DNA restriction pattern of Indonesian *P. multocida* isolates originated from cattle and buffaloes associated with haemorrhagic septicaemic diseases demonstrated different pattern to those of vaccine Katha strain, poultry strains as well as the reference strains currently kept at Balitvet Culture Collection (BCC) unit. Two *P. multocida* isolates derived from ducks with cholera disease showed similar pattern support the previous findings which exhibited similar pathogenicity and vaccine protection. The majority of HS causing *P. multocida* isolates from some provinces in Indonesia belong to *Apal* type 1 (7 isolates), six of these isolates belong to *BamHI* type 1. The *BamHI* restriction endonuclease digestion demonstrated higher discriminatory than that of *Apal*. These restriction endonucleases digestion combined with PFGE analysis were effective for molecular differentiation of *P. multocida* strains and could be applied to other bacterial veterinary pathogens as well as for local isolate vaccine selection.

Key words: *Pasteurella multocida*, restriction endonuclease analysis, genomic DNA, PFGE

ABSTRAK

SUPAR. 2003. Restriksi endonuklease DNA genomik *Pasteurella multocida* isolat Indonesia, galur katha dan galur referen yang dianalisa dengan PFGE. *JITV* 8(3): 196-204.

Bakteri *P. multocida* dapat menyebabkan penyakit pada berbagai binatang ternak dan hewan liar. Galur atau isolat yang penting ialah dikenal sebagai penyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* (HS), di Indonesia terkenal dengan nama penyakit ngorok atau SE (*Septicemia epizootica*) pada sapi dan kerbau, kolera pada unggas. Pengendalian penyakit SE pada ternak di Indonesia dilakukan dengan aplikasi vaksin inaktif *P. multocida* strain Katha dari Burma. Sampai saat ini belum banyak teknik biologi molekular untuk diferensiasi isolat lokal *P. multocida* dari berbagai tempat di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi pola genetik *P. multocida* isolat lokal, strain Katha dan galur referen lainnya. Sebanyak 38 sampel *P. multocida* isolat Indonesia dan luar negeri, strain vaksin (Katha) dari Burma, galur acuan dipakai untuk penelitian ini. DNA genomik dari tiap sample dipotong dengan enzim restriksi endonuklease *Apal* dan atau *BamHI*, selanjutnya dianalisa secara *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). Hasil digesti dengan enzim *Apal* dan analisis secara PFGE dari sampel tersebut menunjukkan pola fragmen DNA 16 tipe dari 34 sampel sedangkan 4 sampel tidak dapat ditentukan. Penggunaan enzim *BamHI* dapat dibedakan menjadi 20 tipe. Pola fragmen DNA genomik *P. multocida* dari sapi dan kerbau penderita penyakit SE berbeda dengan galur vaksin strain Katha, isolat dari itik dan berbagai strain *P. multocida* dari unggas yang saat ini disimpan pada Balitvet Culture Collection (BCC). Dua isolat *P. multocida* dari itik penderita kolera menunjukkan pola fragmen DNA genomik yang serupa, hasil ini mendukung hasil penelitian sifat patogenitas dan proteksi vaksin. Kebanyakan isolat *P. multocida* dari kasus SE pada sapi dan kerbau di beberapa propinsi di Indonesia tergolong dalam *Apal* tipe 1 (7 isolat). Enam dari 7 isolat tersebut tergolong dalam kelompok *BamHI* tipe 1, hanya terdapat satu isolat dari Izatnagar India. Dengan demikian restriksi endonuklease *BamHI* menunjukkan tingkat perbedaan yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim *Apal*. Penggunaan kedua

enzim restriksi endonuclease tersebut untuk digesti DNA genomik dan dikombinasikan analisis fragman DNA secara PFGE sangat efektif untuk molekular biologi analisis dalam deferensiasi galur-galur atau isolat *P. multocida* dan teknik ini dapat diaplikasikan untuk bakteri veteriner lainnya dan seleksi kandidat vaksin.

Kata kunci: *Pasteurella multocida*, restriction endonuclease analysis, genomic DNA, PFGE

PENDAHULUAN

Pasteurellosis akibat infeksi *Pasteurella multocida* dan atau *P. haemolytica* merupakan penyakit penting menyerang ternak sapi, kerbau, ruminan kecil, unggas dan ternak lain. Galur atau strain *P. multocida* secara konvensional dapat dibedakan berdasarkan sifat antigen kapsul (serogrup) dan sifat antigen somatik (serotipe). Berdasarkan sifat-sifat kapsul *P. multocida* dapat dikelompokkan menjadi 5 serogroup (berdasar sifat reaksi hemaglutinasi, A, B, C, D, E) (CARTER dan RUNDEL, 1975; RIMLER dan RHODES, 1989; RIMLER, 1992). Berdasarkan sifat-sifat antigen somatik, strain *P. multocida* dapat dibedakan menjadi 16 serotype atas dasar reaksi difusi presipitasi (HEDDLESTON *et al.*, 1972).

P. multocida serogroup B:2 dan E:2 menyebabkan *Hemorrhagic septicaemia* (HS) atau *Septisemia epizootika* (SE) pada ternak ruminan, serogroup A menyebabkan pleuropneumonia fibrosa (CARTER dan DE ALWIS, 1989; DE ALWIS, 1992). *P. multocida* serogroup A (serotypes 1,3,4) menyebabkan penyakit kholera unggas atau *fowl cholera* pada ayam dan kalkun yang ditandai juga dengan septisemia akut dengan gejala spesifik adanya koagulasi darah pada pembuluh darah (RHOADES dan RIMLER, 1990). Di Indonesia, *fowl cholera* merupakan penyakit yang penting menyerang itik dan ayam (POERNOMO, 1980; SUPAR *et al.*, 2000; 2001a,b).

Hemorrhagic septicaemia yang disebabkan oleh *P. multocida* serogroup B dan E menyerang secara akut dan mewabah pada ternak sapi, kerbau dan ternak lain yang dibudidayakan. Penyakit ini tersebar luas di berbagai tempat di dunia baik sub tropis maupun tropis (CARTER dan DE ALWIS 1989 dan DE ALWIS, 1992). Di Indonesia, penyakit SE sangat penting dalam bidang pengembangan dan produksi peternakan, sering terjadi wabah dan menyebabkan kematian ternak sapi dan kerbau. Penyakit ini telah menyebar hampir di semua propinsi dan menyebabkan kerugian ekonomi sekitar US\$ 8,6 juta setiap tahun (RONOHARDJO *et al.*, 1985).

Program vaksinasi dengan vaksin mati *P. multocida* (strain Katha dari Burma) untuk pengendalian kasus atau wabah SE di berbagai tempat (propinsi) di Indonesia sejak 30 tahun yang lalu (SJAMSUDIN, 1971; 1997). Kasus dan wabah SE masih sering terjadi dan dilaporkan dari tahun ke tahun (SUPRIATNA dan MADJID, 1997). Permasalahan masih sering terjadinya kasus SE atau wabah SE tidak diketahui secara jelas dan menyeluruh. Walaupun efektifitas vaksin dan program vaksinasi dievaluasi dengan berbagai cara,

seperti: determinasi dan penentuan *disease incidence rate* sesudah program vaksinasi, analisis titer antibodi pada hewan pasca vaksinasi (NATALIA dan PRIADI, 1999; NATALIA dan PATTEN, 1993; 1994). Pada penelitian pengembangan vaksin pada tahun 1990-an menunjukkan bahwa vaksin *P. multocida* isolat lokal memberikan proteksi lebih baik terhadap uji tantangan galur homolog dan heterolog pada hewan percobaan sapi dan kerbau (RAMDANI, 1997). Hasil serupa dapat diketahui bahwa vaksin inaktif *P. multocida* isolat lokal dari itik dapat memberikan proteksi lebih baik dibandingkan dengan galur impor terhadap uji tantangan galur homolog dan heterolog pada itik percobaan (SUPAR *et al.*, 2001a,b). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi molekular genetik isolat lapang *P. multocida* penyebab SE dan kolera unggas dari Indonesia dan galur vaksin (Katha strain) serta galur referen yang lain.

MATERI DAN METODE

Bakteri *P. multocida*

Bakteri *P. multocida* isolat lokal (Indonesia) yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari 13 isolat dari kasus SE atau pasteurellosis pada sapi dan kerbau, 7 isolat dari itik dan ayam, 14 strain referen dan Katha (vaksin) strain dari berbagai laboratorium veteriner yang saat ini disimpan pada unit Balitvet Culture Collection (BCC) dan 4 isolat (3 dari Sri Lanka dan 1 isolat *P. haemolytica* dari Scottlandia yang disimpan di Unit Bakteriologi Maredun Research Institute (MRI) (Tabel 1). Bakteri isolat lokal diperoleh dari berbagai kasus penyakit SE dan pasteurellosis *fowl cholera* pada itik dan ayam di Indonesia. Isolat bakteri terpilih dikemas dalam bentuk kering beku dan dibawa ke MRI setelah mendapat ijin (*import permit*).

Reviving sampel bakteri

Isolat bakteri atau strain *Pasteurella* spp. yang dibawa setelah sampai di tempat laboratorium, ampul dibuka, sebanyak 200 µl nutrien cair dimasukkan ke dalam ampul, materi padat (bakteri) dilarutkan dan diinkubasi dalam *walk in incubator* pada susu 37°C sambil dikocok pada kecepatan 200 rpm. Setelah inkubasi tiap isolat diinokulasikan pada agar darah (darah domba 5%) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh diamati, beberapa koloni

terpilih dari tiap sampel disimpan dalam *cryo-bank beads* (Mast Group Ltd, UK) dan disimpan pada suhu – 70°C untuk penyimpanan jangka panjang. Satu koloni dari tiap isolat yang sama dipilih untuk diperiksa secara *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) dan konfirmasi kemurniannya (*P. multocida*). Tiap isolat *P. multocida* diidentifikasi ulang secara biokhemik, dengan reaksi fermentasi karbohidrat (gula-gula) menggunakan medium cair *broth purple* medium yang mengandung 1% arabinose, dulcitol, sorbitol, threholose atau xylose; kultur diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati adanya reaksi terbentuknya asam sesudah inkubasi 1 - 7 hari. Data pembacaan reaksi yang diamati dikonsultasikan pada buku identifikasi bakteri (COWAN, 1981). Selanjutnya dilakukan penelitian karakter yang lain dan uji sifat molecular genetiknya.

Penyiapan pembuatan agarose-plug yang mengandung whole sel bakteri

Whole cell bacterial-agarose plugs disiapkan mengikuti prosedur yang ditulis oleh TOWNSEND *et al.* (1997) dan GUNAWARDANA *et al.* (2000) dengan sedikit modifikasi. Secara singkat sebagai berikut: satu atau dua buah *cryo-bank beads* dari tiap sampel diinkubasi dalam media nutrien broth, diinkubasi pada suhu 37°C sambil dikocak seperti sebelumnya. Setelah inkubasi, 1,5 ml dari tiap kultur cair dari tiap sampel dimasukkan dalam tabung Eppendorf dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan sel berupa *pellet* dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) 2 kali, kemudian dicuci lagi 3 kali dengan larutan Pett IV (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1M sodium Chloride). Endapan sel terakhir (pelet sel) dilarutkan dalam 0,5 ml Pett IV dan dipanaskan dalam penangas air yang bersuhu 40°C selama 20 menit. Selanjutnya sebanyak 0,5 ml larutan 2% agarose (Promega V211A, USA) ditambahkan ke dalam tiap sampel. Baik larutan agarose maupun suspensi sel telah diseimbangkan suhunya 40°C sebelum dicampur. Kedua macam bahan tersebut dicampur hingga homogen dengan pipet mikro, dan selanjutnya dibagi-bagi dan dimasukkan ke dalam *plug mould* (cetakan agarose). Setelah campuran sel-agarore membeku (*plug*), *agarose-plug* (berupa batang-batang campuran dari agarose dan sel) dikeluarkan dari mould (cetakan) dan dimasukkan ke dalam botol bijou yang berisi larutan lysis buffer (6 mM Tris buffer, 1 M sodium chloride, 0,1 mM EDTA, 0,2% Na-deoxycholate, 0,25% N-lauroyl sarcosin, 0,5% polyoxyetelele 20 cetyl ether Brij P58884, 0,1% larutan lysozyme segar, 0,02% RNase) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Esok harinya larutan *lysis buffer* dibuang dan diganti dengan larutan ESP (0,5 M EDTA, 1,0% N-lauroyl sarcosin, 0,1% Proteinase K Sigma P2308) dan diinkubasi pada penangas air pada suhu 50°C selama 48 jam. Sesudah

inkubasi, larutan ESP dibuang sebanyak 5 ml larutan Tris EDTE (TE) yang mengandung 5µl 0,1M phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) dimasukkan ke dalam botol bijou yang berisi *plugs* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit sambil digoyang pelan-pelan. Agarose plug kemudian dicuci dengan buffer TE 6 kali (15 menit tiap kali pencucian). Irisan dari lempengan *agarose (plug)* yang mengandung DNA dari sel bakteri disiapkan dengan memotong *agarose-plug* dari salah satu ujung *plug* selebar kurang lebih 4 mm dengan silet yang tajam bersih dan steril. Potongan *agarose* ini untuk didigesti dengan enzim restriksi endonuklease. Sisa *agarose-plug* dimasukkan dalam 0,5 MEDTA pH 8 dan dimasukkan dalam lemari 4°C untuk penyimpanan yang relatif lama.

Digesti DNA dalam agarose plug strip dengan enzim restriksi endonuklease

Enzim restriksi endonuklease yang dipakai dalam penelitian ini ialah ApaI dan atau BamHI (Boeringer Mannheim). Tiap sampel plug strip yang mengandung DNA bakteri yang diperiksa dimasukkan dalam tabung Eppendorf, sebanyak 300 µl buffer restriksi atau sering disebut perlakuan penyeimbangan (270µl air suling bebas nuklease, buffer restriksi 10 x 30 µl, 1,5 µl suspensi bovine serum albumin (BSA) diinkubasikan dalam suhu kamar selama 1 jam. Bila DNA *agarous plug* sudah pernah disimpan dalam larutan EDTA 0,5 M, harus dicuci dengan buffer TE 6 kali (15 menit tiap kali pencucian) sebelum diperlakukan dengan larutan buffer restriksi penyeimbang. Setelah inkubasi *equilibration solution* dibuang, sebanyak 150 µl suspensi enzim restriksi baik ApaI atau BamHI (135 µl air suling bebas nuklease, 15 µl 10x buffer restriksi, 1,5 µl BSA, 2 µl enzim restriksi), selanjutnya diinkubasi selama 48 jam dalam penangas air yang bersuhu 30°C untuk enzim ApaI dan 37°C untuk enzim BamHI, sesuai dengan rekomendasi produsen enzim. Sebanyak 15 µl EDTA 0,5 M pH 8 ditambahkan dalam campuran digesti tersebut apabila elektroforesis dari *digested plug strip* tersebut ditunda hari berikutnya, untuk menghentikan aktifitas enzim restriksi. Sebelum DNA *agarose digested plug strip* dari tiap sampel dimasukkan ke dalam lubang sampel pada gel agarose dicuci dulu dengan buffer TE.

Analisis DNA genomik secara pulsed-field gel electrophoresis PFGE)

Elektroforesis gel agarose yang mengandung sample DNA genomik *P. multocida* yang disiapkan dalam *plug strip* dilakukan dengan menggunakan alat pulsed field gel electrophoresis CHEF-DRII system (Bio-Rad), cara melakukan secara singkat sebagai berikut: Sesudah proses digesti dengan enzim restriksi agarose *plug strip*

Tabel 1. Sampel *P. multocida*, galur referen dan isolat lokal (Indonesia) yang dianalisa

Nomor urut	Kode isolat lokal atau referen	Asal isolat atau strain Indonesia/lainnya	Sumber		Serotipe
			Hewan	Penyakit	
01	BCC 2259	Kalimantan Selatan	Sapi	SE	
02	PMK1	Kalimantan Selatan	Kerbau	SE	
03	PM 5	Yogyakarta	Sapi	SE	
04	PM 6	Yaogyakarta	Sapi	SE	
05	PMKT	Burma (galur katha)	Sapi	SE	Carter's B
06	BCC 2031	Sri Lanka	Sapi	SE	Carter's B
07	DY2	Jawa Tengah	Itik	Kholera	
08	BCC 2331	Tangerang Jawa Barat	Itik	Kholera	
09	BCC 1878	Kupang (Timor Barat)	Sapi	SE	
10	BCC 2256	Jawa Tengah	Sapi	SE	
11	BCC 2262	Jawa Barat	Sapi	SE	
12	BCC 2263	Jawa barat	Sapi	SE	
13	BCC 2157	Jawa Tengah	Sapi	SE	
14	BCC 360	Jawa Barat	Sapi	SE	
15	BCC 2261	Jawa Barat	Sapi	SE	
16	BCC 2332	Yogyakarta	Sapi	SE	
17	BCC 346	Izatanagar (India)	Kerbau	SE	
18	BCC 356	Sydney Uni. Australia	Sapi	SE	
19	BCC 344	Sydney Uni. Australia	Sapi	SE	
20	BCC 1366	NADC M-1304	Bison		Hed. group 2
21	BCC 347	ATCC 43020 IMVS Aust.	Sapi		Carter's E
22	BCC 1457	Jawa Tengah	Sapi	SE	
23	BCC 2009	Sri Lanka	Sapi	SE	Carter's B
24	BCC 2047	Balivet Jawa Barat	Itik	Kholera	
25	BCC 2048	Balivet Jawa Barat	Ayam	Kholera	
26	BCC 2049	Baslitvet Jawa Barat	Ayam	Kholera	
27	BCC 2050	Balivet Jawa Barat	Ayam	Kholera	
28	BCC 2051	Balivet Jawa Barat	Ayam	Kholera	
29	BCC 1360	NADC P-1581	Ayam		Hed. group 8
30	BCC 1361	NADC P-1987	Gull		Hed. group 7
31	BCC 1363	NADC P-1702	Ayam		Hed. group 5
32	BCC 1372	NADC P-1591	Sapi		Hed. group 14
33	BCC 1376	NADC P-2100	Kalkun		Hed. group 10
34	BCC353	IMVS Australia	Sapi		Rob. type 1
35	M7/2	MRI Scotland UK	Sapi		
36	SL1	Sri Lanka (MRI)	Sapi		
37	SL2	Sri Lanka (MRI)	Gajah		
38	SL3	Sri Lanka (MRI)	Babi		

dimasukan ke dalam lubang pada gel agarose (Promega) dengan konsentrasi 1% yang disiapkan dalam 0,5 buffer TBE (10x TBE: buffer Tris 108 g/l, Boric acid 55g/l, 0,5 M EDTA 40 ml/l). Ukuran lubang sedemikian rupa telah didesain oleh pabrik yang memproduksi alat tersebut, setelah agarose *plug strip*

dimasukan ke dalam lubang kemudian ditutup (*sealed*) dengan larutan agarose 1% bersuhu 50°C. Disiapkan 2 liter buffer 0,5 TBE dan dimasukan ke dalam tanki elektroforesis dan suhu selama proses elektroforesis 14°C. Kemampuan resolusi pada sistem elektroforesis CHEF-DRII ditentukan sebagai berikut: Untuk sampel

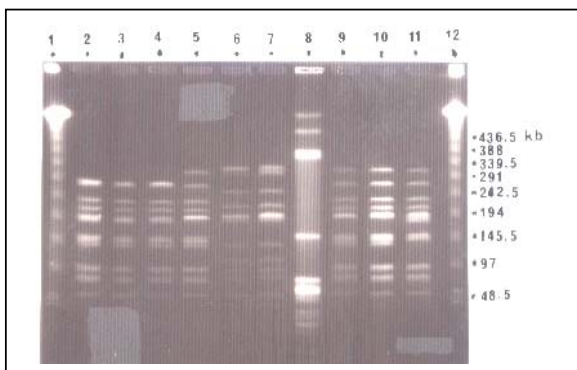
yang digesti dengan ApaI: *gradient voltage* 6 volt/cm, waktu *running* 23 jam, *initial switch time* (IST) 1 detik, *final switch time* (FST) 40 detik. Untuk sampel yang digesti dengan enzim BamHI, *gradient voltage* 6 volt/cm, waktu *running* 20,2 jam, IST 0,5 detik, FST 6,5 detik. DNA penanda lambda PFGE 340 (Promega) dan DNA penanda Lambda HindIII disiapkan dalam bentuk plug strip diikuti dalam setiap kali melakukan elektroforesis. Sesudah elektroforesis fragmen DNA dapat dilihat setelah gel diwarnai dengan ethidium bromide 1 mg/ml (Promega) (100 µl dalam 700 ml aquadest) selama 30 menit. Agarose kemudian dilakukan destaining 3 kali dalam aquadest masing-masing 10-20 menit. Setelah itu, gel dilihat sinar dengan sinar UV illumination (Amersham Pharmacia Biotech) dan dilihat secara visual melalui layar komputer, (Amersham Pharmacia Biotech). DNA yang mengikat ethidium bromide yang terpapar sinar UV tampak bersinar, gambar dari tiap gel juga ditangkap (*captured/ scanning*) dicetak dengan printer komputer untuk analisis secara visual dan dapat disimpan dalam hard disk untuk analisis secara komputerisasi.

Data analisis

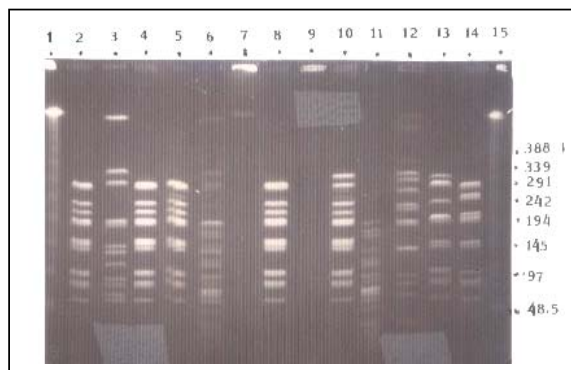
Profile DNA dari hasil pemotongan secara restriksi endonuklease ApaI atau BamHI dianalisa secara terpisah untuk menentukan type PFGE-ApaI atau Type PFGE BamHI. Banyaknya fragmen DNA dari setiap sampel diamati secara visual dan dibandingkan antara sampel dari suatu strain/isolat dengan strain/isolat yang lain. Sedangkan data yang ditangkap dengan komputer dianalisa dengan menggunakan program IMAGE MASTER ID ELITE (Amersham Pharmacia Biotech) untuk mengetahui dan menentukan persamaan dan perbedaan profile DNA dari satu atrai terhadap strain yang lain, hasil analisis dalam bentuk dendogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

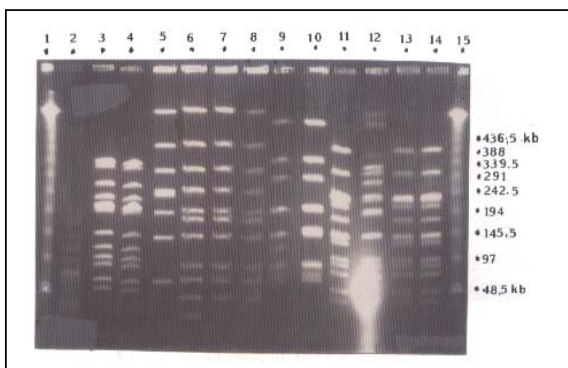
Dalam penelitian ini genomik DNA *P. multocida* dalam bentuk whole sel dilakukan *embedding* dalam agarose (*plug*), dilakukan lisis *in situ* selanjutnya dipotong-potong dengan enzim restriksi endonuklease dalam tabung Eppendorf. DNA yang terdapat dalam agarose yang telah dipotong dimasukan ke dalam lubang (*well*) agarose 1%. Setelah dianalisa secara PFGE, fragmen DNA akan mengalami pemisahan menurut besarnya fragmen DNA genomik, setelah dilakukan pewarnaan dengan ethidium bromide, disinari dengan sinar ultraviolet (UV) fragmen dapat dilihat secara visual. Untuk dokumen penelitian difoto dengan alat pemotret polaroid. Disamping itu, gambar dari kamera diproyeksikan pada layar komputer dan dapat ditangkap (*captured*) atau *scanning* dan dapat disimpan dalam disket atau hard dish untuk analisa lebih akurat dalam tahap selanjutnya (Gambar 1 a, b, c). Analisis besar atau kecilnya ukuran fragmen dapat dilakukan secara visual, analisis yang lebih teliti dapat dilakukan secara komputerisasi. Penggunaan enzim restriksi endonuklease ApaI untuk memotong-motong DNA genomik *P. multocida* pengamatan secara visual dapat menghasilkan fragmen DNA antara 7-15 fragmen, besarnya fragmen yang diamati secara visual berkisar antara 20-400 kilo *base pair* (kb). Fragmen DNA dari tiap sampel dari hasil pemotongan dengan enzim ApaI diamati dan dibandingkan antara satu dengan yang lain. Sampel yang menunjukkan profile yang sama dinyatakan tipe yang sama. Dari analisa 37 sampel *P. multocida* secara visual dapat diketahui 34 sampel dapat dipotong dengan enzyme ApaI menghasilkan fragmen yang jelas, dan 4 sampel tidak menunjukkan gambaran fragmen DNA yang jelas. Dari analisa isolat Indonesia maupun galur referen secara visual dapat dikelompokkan menjadi 16 macam ApaI tipe (Tabel 2).



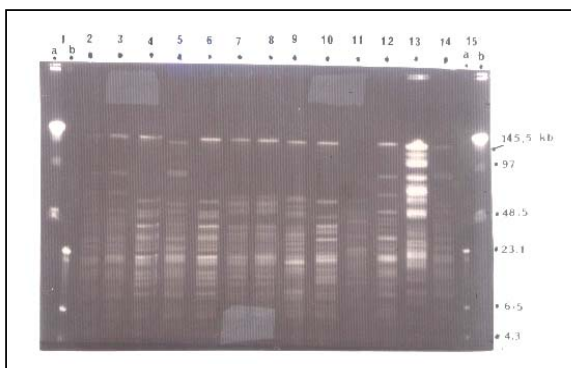
Gambar 1a. Foto profil DNA genomik *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease ApaI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1 dan 12: DNA penanda PFG 340; kolom 2 sampai 11: DNA sampel No 01, 02, 03, 045, 07, 08, M7/2, SL1, SL2, SL3



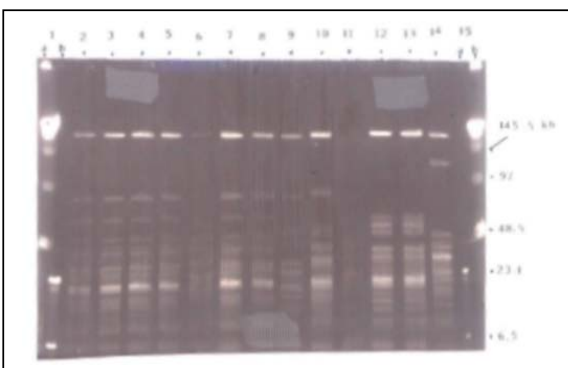
Gambar 1b. Foto profil DNA genomik *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease ApaI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1 dan 15: DNA penanda PFG 340; kolom 2 sampai 14: DNA sampel No 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21



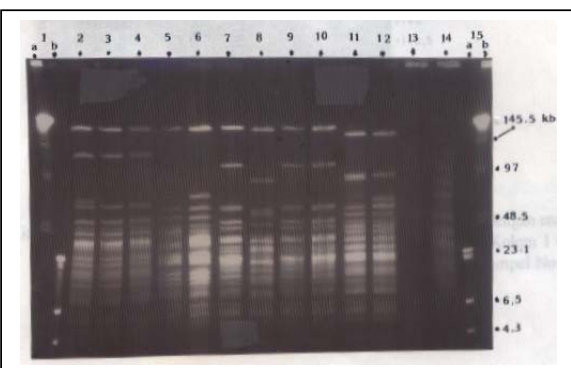
Gambar 1c. Foto profil DNA genomik *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease ApaI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1 dan 15: DNA penanda PFG 340; kolom 2 sampai 14: DNA sampel No 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34



Gambar 2a. Foto profil genomik DNA *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease BamHI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1a dan 15b DNA penanda PFG340; kolom 1b dan 15a DNA penanda lambda HindIII; kolom 2 sampai dengan 14 berturut-turut DNA sampel No 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 14, 18, 20, M7/2, SLI



Gambar 2b. Foto profil genomik DNA *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease BamHI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1a dan 15b DNA penanda PFG340; kolom 1b dan 15a DNA penanda lambda HindIII; kolom 2 sampai dengan 14 berturut-turut DNA sampel No 01, 09, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25



Gambar 2c. Foto profil genomik DNA *P. multocida* setelah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease BamHI dan dianalisa secara PFGE. Kolom 1a dan 15b DNA penanda PFG340; kolom 1b dan 15a DNA penanda lambda HindIII; kolom 2 sampai dengan 13 berturut-turut DNA sampel No 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, SL2, SL3, 16, 16H

Dari pengamatan profile fragmen DNA tersebut beberapa *P. multocida* yang berasal dari kasus SE dari beberapa propinsi tergolong dalam beberapa tipe ApaI 1. Sebagai contoh sampel kelompok ApaI tipe 1, terdiri dari *P. multocida* dari sapi dan kerbau (01, 02, 03, 09, 11, 12, 15). Tetapi ada pula *P. multocida* dari hewan sapi penderita SE tergolong dalam kelompok profile DNA yang berbeda (sampel 13, 18, 22, termasuk ApaI tipe 3). *P. multocida* dari sapi yang dipakai untuk produksi vaksin di Indonesia (galur Katha dari Burma No 05) dan strain kerbau di India (Nomor 17) termasuk dalam kelompok ApaI tipe 2. Isolat sapi, gajah dan babi (Nomor 36, 37, 38) dari Sri Lanka (ApaI tipe 17)

menunjukkan profile DNA berbeda dengan *P. multocida* yang diisolasi dari Indonesia.

Dua isolat *P. multocida* (No 07, 08) yang diisolasi dari itik penderita kholera dari tempat yang berbeda menunjukkan profile DNA serupa (ApaI tipe 8), sedangkan 1 isolat dari itik lainnya (No 24) profil DNA genomiknya tergolong dalam kelompok ApaI tipe 9. Dua galur *P. multocida* dari Sydney University (No 18 dan 19) menunjukkan profile DNA yang berbeda, nomor 18 termasuk dalam kelompok ApaI tipe 3 sama dengan isolat dari Jawa Tengah (No13 dan 22), dan No 19 berbeda dengan semua bakteri yang diperiksa (ApaI tipe 5) sama dengan strain dari bison dan bunia.

Empat isolat dari ayam di Indonesia yang diisolasi di Balitvet (No 26, 27, 28) termasuk dalam ApaI tipe 11, sedangkan nomor 25 sangat berbeda dengan yang lainnya tergolong dalam ApaI tipe 10. Lima strain acuan *P. multocida* berasal NADC menunjukkan perbedaan profile DNA genomiknya. Satu strain dari kalkun (No 33) profile DNANYa sama dengan *P. multocida* asal anak sapi yang berasal dari IMVS (No 34). Sampel no 35 (*P. haemolytica*) secara visual sangat jelas bedanya.

Hasil analisis genomik DNA yang dipotong dengan enzim BamHI menunjukkan sifat diskriminatif lebih tinggi dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan ApaI. Dari 38 sampel yang diperiksa, 1 sampel (no 16)

tidak dapat dievaluasi, dan 37 sample menunjukkan profile yang dapat dievaluasi secara visual (Gambar 2. a, b, dan c). Gambar profile DNA yang ditangkap dengan komputer dan dicetak dengan printer komputer dapat dianalisa secara visual, dibandingkan satu dengan yang lain, dapat dikelompokan menjadi 21 macam tipe BamHI (Tabel 3). Hal yang menarik dari hasil analisis genomik DNA genomik menggunakan enzim restriksi endonuklease BamHI, secara genetik *P. multocida* no 01, 09, 11, 12, 13, 15 termasuk dalam satu kluster sama dengan hasil analisis dengan enzim ApaI (Tabel 2 dan Tabel 3), demikian halnya dengan sampel dari ayam No 26, 27, 28, sampel dari itik no 07 dan 08 serta sampel nomor 33 dan 34.

Tabel 2. Restriksi endonuklease ApaI pada DNA *P. multocida* dan analisis secara PFGE

<i>P. multocida</i>		Daerah asal di Indonesia atau lainnya/strain	Banyak fragmen	Ukuran fragmen (kb)		Restriksi ApaI tipe
Nomor	Sumber			Terbesar	Terkecil	
01	Sapi	Kalimantan Selatan (2259)	10	291	20	1
02	Kerbau	Kalimantan Selatan (PMK1)	10	291	20	1
03	Sapi	Yogyakarta (PM5)	10	291	20	1
09	Sapi	Kupang Timor Barat (1878)	10	291	20	1
11	Sapi	Jawa Barat (2262)	10	291	20	1
12	Sapi	Jawa Barat (2263)	10	291	20	1
15	Sapi	Jawa Barat (2261)	10	291	20	1
05	Sapi	Burma (galur katha)	11	330	50	2
17	Kerbau	Izatnagar, India (346)	11	330	50	2
13	Sapi	Jawa Tengah (2157)	15	220	15	3
18	Sapi	Sydney Uni. Aust. (356)	15	220	15	3
22	Sapi	Jawa Tengah (1475)	15	220	15	3
10	Sapi	Jawa Tengah (2256)	12	340	15	4
19	Sapi	Sydney Uni. Aust. (344)	12	340	15	5
20	Bison	NADC M-1404 (1366)	12	340	15	5
32	Sapi	NADC P-1591 (1372)	12	340	15	5
21	Bunia	ATCC 4020 IMVS Aust. (347)	12	340	15	6
23	Sapi	Sri Lanka (2009)	12	340	15	7
07	Itik	Jawa Tengah (DY2)	11	340	48.5	8
08	Itik	Jawa Barat (2331)	11	340	48.5	8
24	Itik	Balitvet Jawa Barat (2047)	12	340	15	9
25	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2048)	7	390	15	10
26	Ayam	Balitvet Jawa Jarat (2049)	10	390	30	11
27	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2050)	10	390	30	11
28	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2051)	10	390	30	11
29	Ayam	NADC P-1581 (1360)	8	436	60	12
30	Gull	NADC P-1987 (1361)	9	436	20	13
31	Kalkun	NADC P-1702 (1363)	11	390	15	14
33	Kalkun	NADC P-2100 (1376)	13	390	15	15
34	Sapi	IMVS Australia (353)	13	390	15	15
35	Sapi	UK (MRI) <i>P. haemolytica</i> Serotipe A1 (M7/2)	10	390	40	16
36	Sapi	Sri lanka (MRI) SL1	10	330	50	17
37	Gajah	Sri Lanka (MRI) SL2	10	330	50	17
38	Babi	Sri Lanka (MRI) SL3	10	390	50	17

Tabel 3. Restriksi endonuklease BamHI pada DNA *P. multocida* dan dianalisa secara PFGE

<i>P. multocida</i>		Daerah asal di Indonesia atau lainnya/stran	Banyaknya fragmen	Ukuran fragmen (kb)		BamHI tipe
Nomor	Sumber			Terbesar	Terkecil	
01	Sapi	Kal. Selatan (2259)	18	90	6	1
09	Sapi	Kupang Timor (1878)	18	90	6	1
11	Sapi	Jawa Barat (2262)	18	90	6	1
12	Sapi	Jawa Barat (2263)	18	90	6	1
13	Sapi	Jawa Tengah (2157)	18	90	6	1
15	Sapi	Jawa Barat (2261)	18	90	6	1
17	Kerbau	Izatnagat India (346)	18	90	6	1
02	Kerbau	Kal. Selatan (PMK1)	19	90	4	2
03	Sapi	Yogyakarta (PM5)	19	90	4	2
04	Sapi	Yogyakarta (PM6)	21	70	5	3
06	Sapi	Sri Lanka (2031)	21	70	5	3
05	Sapi	Burma Strain katha	20	95	5	4
36	Sapi	Sri Lanka (MRI) SL1	20	95	5	4
14	Sapi	Jawa Tengah (360)	20	60	4	5
25	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2048)	13	120	7	6
07	Itik	Jawa Tengah (DY2)	20	70	5	7
08	Itik	Tangerang Ja-Bar (2331)	20	70	5	7
18	Sapi	Sydney. Uni. Aust (356)	20	60	5	8
19	Sapi	Sydney Uni. Aust (344)	16	75	5	9
20	Bison	NADC M-1404 (1366)	22	97	5	10
21	Bunia	ATCC 4020 IMVS Aust. (347)	20	80	5	11
22	Sapi	Jawa Tengah (1475)	14	50	6	12
23	Sapi	Sri Lanka (2009)	17	60	5	13
24	Itik	Balitvet Jawa Barat (2047)	17	60	5	13
26	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2049)	18	80	5	14
27	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2050)	18	80	5	14
28	Ayam	Balitvet Jawa Barat (2051)	18	80	5	14
29	Ayam	NADC P-1581 (1360)	18	65	5	15
30	Gull	NADC P-1987 (1361)	24	80	4	16
31	Kalkun	NADC P-1702 (1363)	17	100	5	17
32	Sapi	NADC P-1591 (1372)	17	85	5	18
33	Kalkun	NADC P-2100 (1376)	15	100	5	19
34	Sapi	IMVS Australia (353)	15	100	5	19
35	Sapi	UK, MRI <i>P haemolytica</i>	19	145	5	20
37	Gajah	Sri Lanka (MRI) SL2	16	90	5	21
38	Babi	Sri Lanka (MRI) SL3	16	90	5	21

KESIMPULAN

Dalam penelitian pendekatan secara molekular genetik pada *P. multocida* penyebab penyakit SE pada sapi dan kerbau, kholera itik dan ayam dari beberapa propinsi di Indonesia, galur vaksin SE dan strain referen dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut: Analisa genomik DNA dengan enzim restriksi endonuklease dilanjutkan dengan PFGE menunjukkan isolat *P. multocida* dari sapi dan kerbau penderita *haemorrhagic septicemia* (HS) atau SE profil DNA berbeda dengan strain Katha dari Burma dan referen strain lainnya dari luar negeri; Kebanyakan isolat penyebab SE pada sapi dan kerbau di Indonesia berbeda dengan penyebab kolera unggas dan strain *P. multocida* referen dari luar

negeri. Bertitik tolak dari hasil penelitian molekular genetik *P. multocida* ini, penulis berpendapat *P. multocida* isolat Indonesia lebih mempunyai dampak imunoprotektif dan lebih sesuai sebagai kandidat vaksin anti SE dibandingkan dengan galur luar negeri, namun masih perlu penelitian lebih lanjut. Teknik molekular PFGE sangat mudah dilakukan untuk analisa genetik bakteri, dan dapat diaplikasikan terhadap parasit, tanaman dan biji-bijian, tanpa penggunaan radio isotop *labelling* dan autoradiographi dalam deteksi DNA. Teknik PFGE dapat menyajikan hasil yang sangat diskriminatif terhadap serotype bakteri sejenis (secara fenotipik dan serotipik sulit dibedakan), dan mudah diaplikasikan terhadap bakteri lain

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan kesempatan dalam membiayai program penelitian ini, terutama Bapak Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dan segenap jajarannya yang mengelola proyek PAATP. Di samping itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada PROF. DR WILLIE DONACHIE dan Direktur MRI yang telah mengizinkan melakukan penelitian tersebut. Tak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada DR ALEX LAINSON dan MR KEVIN AITKINSON yang telah memberikan nasehat dan bantuan teknis.

DAFTAR PUSTAKA

- CARTER G. R. and S. W. RUNDELL. 1975. Identification of type strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet Rec.* 96: 43.
- CARTER G. R. and M. C. L. DE ALWIS. 1989. Hemorrhagic septicaemia. In: *Pasteurella and pasteurellosis*. C. ADLAM and J. M. RUTTER (Eds.). Academic Press London. pp. 132-160.
- COWAN S T. 1981. COWAN and STEEL. Manual for the identification of medical bacteria. Second Edition. Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, Melbourne, Sydney.
- DE ALWIS, M.C.L. 1992. Pasteurellosis in Production Animals: A. Review. In: *Pasteurellosis in Production Animals*. PATTEN B.E. et al. (Eds.). Proc. of International Workshop Sponsored by ACIAR, Bali Indonesia August. 1992: 11-22.
- GUNAWARDANA G. A., K. M. TOWNSEND and A. J. FROST. 2000. Molecular characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. *Vet Microbiol.* 72: 97-109.
- HEDDLETSON K. L., J. E. GALLAGER and P. A. REBER 1982. Fowl cholera gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* for avian species. *Avian Dis* 16: 529-534.
- NATALIA L and B. E. PATTEN. 1993. The responses of animal to *Pasteurella multocida* vaccination as measured by PMPT and ELISA. *Penyakit Hewan.* 46 (Edisi Khusus): 15-20.
- NATALIA L. dan B. PATTEN. 1994. Perbandingan respon kekebalan sapi terhadap penyakit ngorok. *Penyakit Hewan* 26(48): 30-35.
- NATALIA, L. dan A. PRIADI. 1999. The use of filter paper for collecting samples for immunodiagnosis of *Pasteurella multocida*: analysis and comparison of the protein composition of filter paper extract and serum. *JITV* 3: 182-187.
- POERNOMO S. 1980. Kasus *Pasteurella multocida* pada itik. *Bulletin LPPH.* 12(19): 42-56.
- RAMDANI 1997. Pengembangan vasin SE dari isolat local untuk pencegahan penyakit ngorok pada sapi dan kerbau. Prosiding simposium sehari penyakit ngorok (*Septicaemia epizootica*, SE). Dalam rangka pelepasan purna bhakti Ahli Peneliti Utama DRH A. SJAMSUDIN. Bogor 19 Agustus 1997 : 44-46.
- RIMLER R. B. 1992. Serology and virulence of hemorrhagic septicaemia *Pasteurella multocida* isolated from domestic animals and feral ruminants. Proc. of an international workshop on pasteurellosis in production animals, held at Bali-Indonesia. 10-13 August 1992: 44-46.
- RIMLER R. B. and K. R. RHODES. 1989. *Pasteurella multocida*. In: *Pasteurella and pasteurellosis*. ADAM, C and J. M. RUTTER (Eds.). Academic Press. p. 340.
- RHODES K. R. and R. B. RIMLER. 1990. Somatic serotype of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts (1976-1988). *Avian Dis.* 34: 193-196.
- RONOHARDJO P, A. J. WILSON and R. G. HIRST 1985. Current livestock diseases in Indonesia. *Penyakit Hewan* 17: 317-325.
- SJAMSUDIN A. 1971. Vaksin oil adjuvant *Septicaemia haemorrhagica*. *Bulletin LPPH3.* Vol 1: 21-28.
- SJAMSUDIN, A. 1997. Pengembangan vaksin *Septicaemia epizootica* (SE). Pros. simposium sehari penyakit ngorok (*Septicaemia epizootica*, SE). Dalam rangka pelepasan purna bhakti Ahli Peneliti Utama DRH A. SJAMSUDIN. Bogor 19 Agustus 1997.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH dan B. POERWADIKARTA. 2000. Patogenesis of *Pasteurella multocida* isolat lokal pada mencit dan ayam. *JITV* 5: 59-64.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH B. POERWADIKARTA dan SJAFAI. 2001a. Pengembangan vaksin kholera unggas: I. Proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada ayam terhadap uji tantangan dengan galur homolog dan heterolog. *JITV* 6: 59-67.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH B. POERWADIKARTA dan SJAFAI. 2001b. Pengembangan vaksin kholera unggas: II. Pantogenitas dan proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada itik percobaan. *JITV* 6: 120-125.
- SUPRIATNA. S dan A. MADJID. 1997. Situasi penyakit *Septicaemia epizootica* (Ngorok) dan program pengendaliannya di Indonesia. Prosiding simposium sehari penyakit ngorok (*Septicaemia epizootica*, SE). Dalam rangka pelepasan purna bhakti Ahli Peneliti Utama DRH. A. SJAMSUDIN. Bogor 19 Agustus 1997.
- TOWNSEND K. M., H. J. S. DAWKINS and J. M. PAPIDIMITRIOU. 1997. Analysis haemorrhagic septicaemia causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alteration gel electrophoresis (FAGE). *Vet. Microbiol.* 57: 383-395.