

**SKRIPSI :**

**TJAHJO BUDI UTOMO**

**PERCOBAAN PASTEURELLA MULTOCIDA  
STREPTOMYCIN DEPENDENT SEBAGAI BAHAN  
VAKSIN UNTUK MENCEGAH FOWL CHOLERA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1984**

PERCOBAAN PASTEURELLA MULTOCIDA STREPTOMYCIN DEPENDENT  
SEBAGAI BAHAN VAKSIN UNTUK MENCEGAH  
FOWL CHOLERA

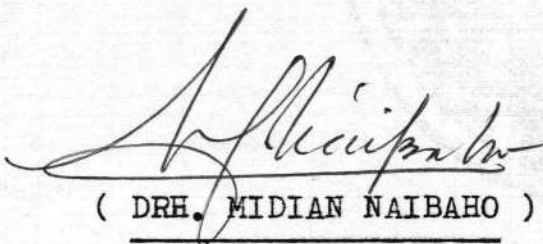
S K R I P S I

DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS  
AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN SYARAT GUNA  
MEMPEROLEH GELAR DOKTER HEWAN

O L E H

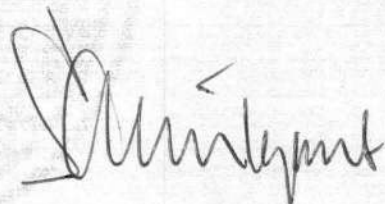
TJAHJO BUDI UTOMO

BOGOR - JAWA BARAT



( DRH. MIDIAN NAIBAHO )

PEMBIMBING UTAMA



( DRH. SOELISTYANTO )

PEMBIMBING KEDUA

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

1984

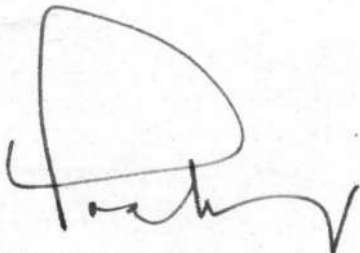
Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik skope maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar DOKTER HEWAN.

Ditetapkan di Surabaya, tanggal : 5 - 1 - 1985.

Panitia Penguji :



Ketua



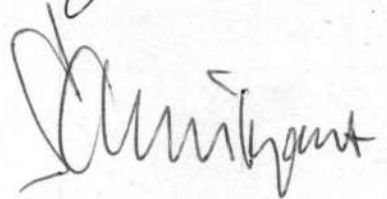
Sekretaris



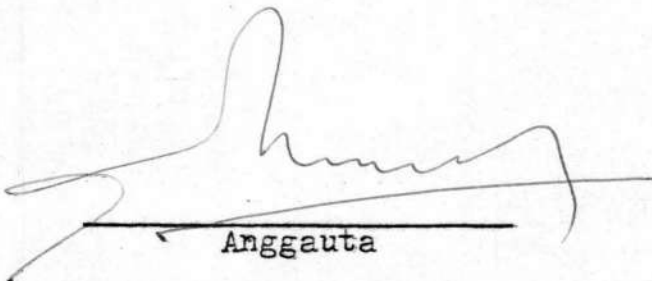
Anggauta



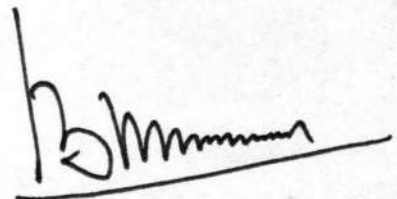
Anggauta



Anggauta



Anggauta



Anggauta

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DRH. Midi an Naibaho Kepala Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas bimbingan yang telah di berikan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan ini.

Kepada DRH. Soelistyanto Dosen Ilmu Penyakit Vi - ral Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, pen lis ucapkan terima kasih atas segala bimbingan yang telah diberikan.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya, atas pemberian stock *Pasteurella multocida* dalam bentuk kering beku beserta skala Mc. Farlandnya.

Terima kasih pula penulis ucapkan kepada Direktur Perpustakaan Bakitwan dan Direktur Perpustakaan Lembaga Biologi Nasional Bogor, atas bantuannya didalam mengumpul kan kepustakaan.

Kepada semua pihak yang telah membantu didalam pe nulisan ini, penulis juga mengucapkan terima kasih.

Penulis.

## DAFTAR ISI

BAB	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH .....	i
DAFTAR ISI .....	ii
DAFTAR TABEL .....	iii
DAFTAR GAMBAR .....	iv
Lampiran .....	iv
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
1. Pasteurella multocida .....	5
1.1. Fowl cholera .....	5
1.2. Sifat pupukan .....	7
1.3. Uji biokimiawi .....	8
2. Mutasi .....	8
2.1. Pengaruh alkylating agent .....	9
2.2. Streptomycin-dependent .....	10
3. Vaksin Fowl Cholera .....	11
III. MATERI DAN METODE .....	15
1. Materi .....	15
2. Metode kerja .....	16
2.1. Preparasi kuman hingga siap untuk di suntikkan .....	16
2.2. Suntikan pada hewan percobaan .....	19
2.3. Isolasi kuman kembali .....	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	21
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	23
VI. RINGKASAN .....	25
DAFTAR KEPUSTAKAAN .....	30

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
I. Hasil Challenge Test pada White Leghorn yang Diberi Mutan <i>Pasteurella multocida</i> Streptomycin-Dependent dan Kontrol. ....	21.

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Pembuatan medium <del>tryptosa</del> agar yang mengandung 0,3 % yeast extract dan streptomycin (medium tays) .....	27
2 Stempel beludru, untuk memindahkan kuman pada plate .....	27
3 Memindahkan kuman dari medium tays ke medium tays yang lain dan medium tay .....	28
4 Pasteurella multocida streptomycin-dependent dalam larutan NaCl fisiologis biakan kuman umur 24 jam diukur dengan standard Mc. Farland 3, dipakai sebagai bahan vaksin .....	28
5 Pasteurella multocida dalam larutan NaCl fisiologis biakan kuman umur 18 jam diukur dengan standard Mc. Farland 4, sebelum dijadikan Mc. Farland 1, dipakai untuk challenge test .....	29
6 Ayam mati setelah di challenge dengan kuman ganas .....	29

Lampiran

## Nomor

1 Pembuatan medium tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 100 microgram Streptomycin per milliliter .....	34
2 Pembuatan medium tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 400 microgram	

Streptomycin per milliliter .....	34
3 Pembuatan alpha-Naphthylamine dalam phosfat buffer pH 6 dengan konsentrasi 0,5 mg per milliliter .....	34



## BAB I

### PENDAHULUAN

*Pasteurella multocida* adalah kuman yang menimbulkan Fowl cholera pada ayam atau bangsa unggas lainnya. Penyakit tersebut disamping menimbulkan kerugian bagi peternak berupa kematian juga menyebabkan menurunnya produksi telur pada ayam yang sedang produksi.

Kejadian Fowl cholera di Surabaya pada tahun 1972 telah dilaporkan oleh DR. R. Maes, dan menurut pengamatan lebih lanjut, pada tahun 1974 dan tahun tahun berikutnya penyakit Fowl cholera tidak hanya menyerang peternakan-peternakan ayam di Surabaya dan sekitarnya saja tetapi juga di daerah lain (21).

Cuaca yang buruk atau kondisi badan yang menurun merupakan salah satu faktor untuk mempercepat timbulnya penyakit, sehingga tidaklah mengherankan apabila peternak sangat berhati-hati didalam memperlakukan ternaknya menjelang perubahan musim (1).

Pemusnahan terhadap ternak yang menderita guna menghindari meluasnya penyakit bukanlah merupakan suatu penyelesaian yang dapat diharapkan, oleh karena itu timbullah pemikiran bagaimana mengatasi penyakit Fowl cholera dengan berbagai upaya untuk mencegahnya.

Di Indonesia dan di negara-negara yang telah maju, pemberian vaksin dalam bentuk kuman yang dilemahkan dipandang sebagai hal yang menguntungkan untuk mengatasi penyakit Fowl cholera (21). Akan tetapi beberapa peneliti berang

gapan bahwa untuk mencapai nilai proteksi yang lebih tinggi dapat digunakan kuman yang telah dimutasikan terlebih dahulu (22).

Bila suatu populasi kuman yang sensitif terhadap streptomycin dibiakkan pada media yang mengandung streptomycin maka sebagian yang berhasil hidup atau tetap hidup akan membutuhkan streptomycin untuk pertumbuhannya, sehingga mutan yang demikian ini disebut sebagai mutan streptomycin-dependent (8,13,19).

Selain cara tersebut diatas, alkylating agent juga dapat digunakan untuk memutasikan kuman sebelum diadaptasikan pada media yang mengandung antibiotika. Karena sifat kuman yang telah mengalami mutasi kurang pathogen pada hewan yang biasanya peka maka dimungkinkan dapat dipakai sebagai bahan untuk menimbulkan kekebalan (2,24).

Beberapa mutan demikian telah dikenal dan digunakan sebagai bahan untuk menimbulkan kekebalan, beberapa diantaranya : Wei dan Carter dengan percobaannya berupa vaksin hidup *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent yang berasal dari strain hemorrhagic septicemia. Strain tersebut dimutasikan dengan menggunakan mutagen berupa N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (N.T.G.), dan didalam percobaan ini vaksin tersebut dapat menahan challenge dengan menggunakan kuman ganas tiga minggu kemudian (24).

Chengapa, Carter dan Chang membuat percobaan serupa berupa vaksin hidup *Pasteurella multocida*-streptomycin-dependent pada kalkun yang diberikan secara per oral dan parenteral sebagai usaha untuk mencegah terjadinya Fowl chole

ra (3).

Penggunaan kuman yang telah mengalami mutasi untuk memperoleh kekebalan telah digunakan bukan hanya terhadap *Pasteurella multocida* saja tetapi juga telah diterapkan terhadap strain-strain lain (7,22).

*Escherichia coli* streptomycin-dependent misalnya, telah dicoba pada anak kera dengan aplikasi secara per oral dan challenge satu bulan setelah pemberian tersebut (24).

Dengan makin meningkatnya kemajuan ilmu dibidang Kedokteran, *Escherichia coli* streptomycin-dependent tersebut telah digunakan sebagai vaksin untuk manusia secara per oral dengan dosis  $1 \times 10^{12}$  kuman tanpa menimbulkan efek sampingan (24).

*Salmonella typhi* streptomycin-dependent yang telah dicoba dengan dosis  $1 \times 10^{11}$  kuman mampu untuk menahan challenge  $1 \times 10^5$  kuman ganas pada sukarelawan (20). Bahkan di-Yugoslavia, Mel dan kawan-kawan telah melakukan uji coba terhadap vaksin hidup *Shigella flexneri* streptomycin-dependent pada sukarelawan dengan dosis bervariasi antara  $10^6$  sampai  $5 \times 10^{10}$  kuman dengan atau tanpa diberi bicarbonat terlebih dahulu. Strain dari vaksin tersebut dapat menimbulkan antibodi dan dapat diisolasi kembali melalui faeces (7).

Melalui skripsi ini, penulis ingin mengungkapkan sedikit tentang mutan streptomycin-dependent tersebut dengan menggunakan *Pasteurella multocida* yang berasal dari bentuk kering beku (seed) sebagai bahannya, dan kuman murni yang dipakai dalam percobaan ini adalah isolat dari suatu

peternakan ayam sewaktu terjadi wabah Fowl cholera.

Salah satu cara untuk menyeleksi kuman yang mengalami mutasi dapat dilakukan dengan tehnik Replica plating, yaitu dengan menggunakan stempel beludru yang disterilkan terlebih dahulu. Stempel tersebut digunakan untuk memindahkan kuman sebagai pengganti ose pada medium selektif dan non selektif hingga dapat diketahui mutan yang hanya dapat tumbuh pada medium selektif (14,23).

Mutan streptomycin-dependent yang banyak diteliti para ahli tersebut terutama mengarah pada pembuatan vaksin, walaupun ada pula yang meneliti dari sudut genetika atau metabolisme dari kuman yang mengalami mutasi (8,22, 25).

Sehubungan dengan hal tersebut, maka penulis mencoba membuat mutan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dengan menggunakan metode yang telah dikemukakan oleh Wei dan Carter (1978) (24). Akan tetapi N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (N.T.G.) yang biasanya dipakai sebagai mutagen diganti dengan alpha-Naphthylamine, karena adanya kesamaan diantara kedua zat kimia tersebut (4).

*Pasteurella multocida* streptomycin-dependent tersebut disuntikkan pada hewan percobaan ayam jenis White Leghorn yang telah berumur lima bulan secara subcutan, setelah itu di challenge dengan kuman ganas tiga minggu kemudian secara intra muscular.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. *Pasteurella multocida*

##### 1.1. Fowl cholera.

Fowl cholera merupakan penyakit infeksiosa pada bangsa unggas yang berjalan secara perakut, akut dan khronis dengan gejala klinis oedema sekitar pial (1). Sejak di temukannya di Eropa pada abad ke 18, hingga kini telah ada kesepakatan bahwa Fowl cholera ditimbulkan oleh *Pasteurella multocida*. Dengan mengambil nama kuman ini pula, maka Fowl cholera juga disebut sebagai avian pasteurellosis (1, 11).

Organisme yang berhasil diisolasi menunjukkan sifat Gram negatif, non motil, coccus atau coccobacillus dengan ukuran 0,6 - 2,6 x 0,25 - 0,4 mikron. *Pasteurella multocida* berbentuk bipolair pada pewarnaan methylene blue, Giemsa atau carbol fuchsin. Sedang bentuk kuman berkapsul dapat dilihat dibawah mikroskop apabila baru diisolasi dari penderita (1,11,16).

Tanda-tanda klinis yang tidak khas menimbulkan kesulitan untuk membedakan dengan penyakit lain yang mirip. Kerugian ekonomi akibat Fowl cholera terutama disebabkan kurangnya ketepatan diagnosa sedini mungkin, disamping akibat sistem tata laksana perusahaan yang kurang baik (21).

Ayam dewasa lebih peka terhadap Fowl cholera dari pada ayam umur 5 - 16 minggu. Bahan pemeriksaan untuk men-

dapatkan kuman murni dapat diambil dari sumsum tulang, hati, jantung, lesi-lesi dan nasal yang berasal dari penderita (10).

Tikus putih dan kelinci dapat dipergunakan sebagai hewan percobaan, sedang marmut bersifat resisten terhadap *Pasteurella multocida* (16). Pada kuda, sapi, kambing, anjing dan kucing hanya menimbulkan abses lokal bila disuntik dengan kuman ini (11).

Fowl cholera bersifat sporadis dan enzootis pada beberapa negara di dunia, meskipun kejadiannya lebih sering pada daerah yang beriklim sedang dari pada negara-negara bagian utara. Sedang di Amerika Serikat kasus Fowl cholera banyak ditemukan di beberapa daerah (1).

Pembahasan mengenai penyakit Fowl cholera menjadi lebih menarik setelah Fowl cholera dinyatakan sebagai penyebab kerugian ekonomi yang cukup besar bagi peternakan. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa : musim dingin, pemberian makanan yang tidak tepat, kurangnya ventilasi, kelembaban serta stress karena berbagai sebab merupakan faktor predisposisi untuk timbulnya penyakit Fowl cholera (11).

Selain vaksin in aktif dalam bentuk oil adjuvant, banyak jenis antibiotika atau preparat sulfa yang diberikan sebagai usaha untuk memberantas Fowl cholera dengan hasil bervariasi (21).

## 1.2. Sifat pupukan.

*Pasteurella multocida* mudah dipupuk pada perbenihan biasa, tetapi koloni yang didapat tidak begitu besar. Untuk mendapatkan hasil yang memuaskan, maka kedalam perbenihan dapat ditambahkan sedikit serum atau darah. Pada blood agar *Pasteurella multocida* dapat tumbuh subur tetapi tidak dapat mengadakan hemolisa (16). Temperatur optimum kurang lebih  $37^{\circ}\text{C}$ , sedang suasana keasaman berkisar antara pH 7 - 7,4 dengan batas antara pH 6 - 8,5. *Pasteurella multocida* bersifat aerob atau fakultatif an aerob, akan tetapi untuk mendapatkan pertumbuhan yang memuaskan diperlukan perbenihan yang bersifat aerob (1). Didalam perbenihan kaldu *Pasteurella multocida* tumbuh seperti awan yang tersebar merata, akan tetapi pada perbenihan tua terlihat adanya endapan pada dasar tabung. Biasanya *Pasteurella multocida* tidak tumbuh pada perbenihan kentang (16).

Carter (1955) membagi bentuk koloni menjadi tiga tipe, yaitu :

- I Koloni mucoid (M) : merupakan koloni berukuran besar pada plat agar, dan bersifat seperti lendir pada perbenihan dengan sifat keganasan sedang.
- II Koloni smooth (Fluorescent) (F) : mempunyai ukuran sedang, tumbuh secara merata dan bersifat ganas pada tikus putih.
- III Rough (blue) : koloni berukuran kecil, terlihat sendiri-sendiri dengan keganasan rendah pada tikus putih (1).

### 1.3. Uji biokimiawi.

*Pasteurella multocida* mempunyai kemampuan untuk memfermentasikan beberapa karbohidrat dan lain lain, sehingga melalui sifat ini pula dapat digunakan suatu diagnosis yang khas terhadap adanya *Pasteurella multocida* dengan menggunakan uji biokimiawi.

Beberapa karbohidrat yang dapat difermentasikan oleh *Pasteurella multocida* antara lain : fruktosa, galaktosa, glukosa, manitol, manosa, sukrosa, gliserol, sorbitol dan xylosa tetapi beberapa karbohidrat seperti arabinosa, dextrin, dulcitol, inositol, inulin, salicin, maltosa, laktosa, raffinosa, rhamnosa dan trehalosa tidak difermentasikan oleh *Pasteurella multocida* (10).

*Pasteurella multocida* bila dipupuk pada blood agar tidak menghemolisa media tersebut dan tidak tumbuh pada medium Mc. Conkey, methyl red test negatif, Voges Proskauer test negatif, indol test positif, katalase test positif. Sedang sifat-sifat lain yang dimiliki oleh *Pasteurella multocida* yaitu : mereduksi nitrat dan methylene blue tidak mengubah lithmus milk dan dapat menghasilkan amoniak (1,10).

### 2. Mutasi

Kuman dapat mengalami mutasi karena berbagai sebab. Selain agent kimia, juga sinar ultra violet dan sinar x dapat dipakai sebagai agent untuk menimbulkan mutasi pada kuman. Disamping itu kuman juga dapat mengalami mutasi secara spontan tanpa diketahui faktor penyebabnya (12,13).



Menurut Watson dan Crick, terjadinya mutasi spontan disebabkan adanya pergeseran tautomeris dari elektron-elektron pada basa-basa purine dan pirimidine yang jarang terjadi (12).

### 2.1. Pengaruh alkylating agent.

Golongan alkylating agent merupakan mutagen yang dapat menimbulkan mutasi pada sel-sel kuman, walaupun secara prinsip adalah sama, namun mekanisme mutasi yang ditimbulkan oleh berbagai alkylating agent adalah berbeda satu dengan lainnya (13).

Beberapa alkylating agent yang dapat menimbulkan mutasi pada kuman antara lain : N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (N.T.G.), 5-bromouracil, etilmetansulfonat dan proflavin (12). Demikian pula pada alpha-Naphthylamine (4).

N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (N.T.G.) merupakan golongan alkylating agent yang paling banyak diteliti sebagai penyebab mutasi (2,12,13,24), telah diketahui sifat dari zat kimia ini dapat menimbulkan perubahan susunan dalam kode-kode genetika sehingga pasangan guanine dan cytosin dapat menggantikan pasangan adenine dan thymine (12).

Walaupun sampai saat ini sudah banyak agent kimia yang dikenal sebagai penyebab mutasi, namun belum banyak diketahui bagaimana sebenarnya mekanisme dari mutasi ini. Sedang hasil dari mutasi dapat diamati melalui sifatnya yang telah berubah (13).

## 2.2. Streptomycin-dependent.

Bila kuman ditumbuhkan pada medium yang mengandung streptomycin maka akan didapat tiga kemungkinan yaitu : sensitif, resisten dan dependent. Kuman yang sensitif tidak tumbuh, kuman resisten masih dapat tumbuh dan juga bila ditumbuhkan pada medium yang tidak mengandung streptomycin. Akan tetapi pada kuman streptomycin-dependent hanya dapat tumbuh bila dipupuk pada medium yang mengandung streptomycin (13). Untuk kontrol dapat dipupuk pada medium yang tidak mengandung streptomycin, dan kuman streptomycin dependent tersebut tidak tumbuh pada medium yang tidak mengandung streptomycin (24).

Ketergantungan kuman terhadap antibiotika telah ditemukan juga pada chloramphenicol dan antibiotika yang lain, akan tetapi hanya yang menyangkut streptomycin saja yang paling banyak diketahui (19).

Kuman streptomycin-dependent, ribosomenya mengikat streptomycin yang mengakibatkan fungsi dari ribosome berubah sehingga berbeda dengan ribosome pada umumnya. Kuman mutan mengandung ribosome yang terlalu terikat atau dibatasi kemampuannya untuk dapat berfungsi tanpa streptomycin. Bila ada streptomycin, maka diikat pada subunit 30 S ribosome yang telah berubah. Mungkin ribosome memperbaikinya hingga terjadi suatu bentuk yang lebih normal. Ribosome yang terikat streptomycin ini berfungsi cukup baik untuk memungkinkan synthesa dari protein yang cukup bagi pertumbuhan sel. Justru kegiatan synthesa protein akan menurun apabila streptomycin tersebut dihilangkan (19). Dari sifat

mulanya, dapat ditarik suatu kesimpulan, bahwa streptomycin diperlukan dan hanya streptomycin ini saja atau mungkin salah satu aminoglikosida lain yang dapat menunjang pertumbuhannya. Hal ini dikemukakan karena telah dapat ditemukan bentuk mutan lain dari streptomycin-dependent dimana kuman masih dapat hidup bila diberi asam amino sebagai pengganti streptomycin untuk menunjang pertumbuhannya. Mutan yang demikian ini disebut sebagai Conditionally streptomycin-dependent (13,19).

Phenomena mutasi terhadap antibiotika dependent mempunyai peranan yang cukup penting didalam bidang bakteriologi dan genetika, akan tetapi tidak banyak artinya untuk pengobatan infeksi secara klinis (19).

### 3. Vaksin Fowl cholera

Selain ayam dan bangsa unggas lainnya, *Pasteurella multocida* juga menyerang kalkun, sehingga kalkun merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam kaitannya dengan vaksin Fowl cholera (3,9,15,18). Uji coba vaksin aktif di laboratorium selain bertujuan untuk memperoleh kekebalan juga lebih dititik beratkan terhadap penggunaan vaksin. Suatu hal yang tidak dikehendaki, yaitu bila vaksin aktif justru menimbulkan malapetaka bagi ternak (15).

Dari berbagai vaksin Fowl cholera yang pernah dibuat, vaksin in aktif masih merupakan bentuk yang paling aman, walaupun nilai proteksi yang ditimbulkan tidak setinggi seperti vaksin aktif (22). Vaksin in aktif dapat dibuat dengan menggunakan *Pasteurella multocida* yang telah dilemahkan terlebih dahulu dengan formalin p.a. 0,5 %, dengan

dosis lebih dari  $1 \times 10^9$  kuman in aktif (21). Sedang vaksin aktif masih perlu peninjauan lebih jauh, baik mengenai dosis dan aplikasi juga pengaruh lain untuk keamanannya (18).

Selain *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent seperti yang telah dikemukakan disini, juga dikenal mutan yang berasal dari seleksi kuman yang masih dapat hidup pada temperatur tinggi atau High Temperature Mutant *Pasteurella multocida* (15). High Temperature Mutant *Pasteurella multocida* mampu menimbulkan proteksi pada kalkun, baik diberikan melalui air minum maupun per tracheal. Uji coba dengan menggunakan kuman ganas memberikan hasil yang memuaskan, baik secara kontak langsung atau per inhalasi dengan swab yang mengandung kuman ganas. Akan tetapi setelah dilakukan penyuntikan kuman ganas secara intra muscular tidak terbukti menimbulkan proteksi, seluruh kalkun tersebut segera mati setelah penyuntikan dilakukan (15).

Menurut Maheswaran et al (1973), pemberian High Temperature Mutant *Pasteurella multocida* secara intra vena dengan dosis  $16,5 \times 10^6$  kuman, membahayakan bagi kalkun, karena sifat dari High Temperature Mutant *Pasteurella multocida* dapat kembali seperti semula, pathogen pada hewan peka (15).

Skala Mc. Farland yang dipakai untuk mengukur kepekatan kuman dapat digunakan dengan cara membandingkan kepekatan cairan yang terdapat dalam skala tersebut dengan suspensi kuman, sehingga dapat diketahui berapa banyak kuman yang digunakan pada hewan percobaan (9,21). Melalui cara i

ni pula, maka challenge test dapat ditentukan dengan per-nasal, palatum, dan intra muscular (6,17).

Penularan melalui palatum sebaiknya dilakukan dengan menggunakan kapas steril yang dicelupkan kedalam kul-tur kuman dalam tryptosa phosfat broth umur 8 - 18 jam (Mc. Farland 1). Sedang penularan secara intra muscular untuk mendapatkan hasil yang akut dapat digunakan 0,1 ml kultur dalam tryptosa phosfat broth umur 8 - 18 jam (Mc. Farland 1) pada pengenceran  $10^{-4}$  (17).

Pada larutan kuman yang disesuaikan dengan skala Mc. Farland 1, berarti jumlah kuman dalam suspensi terse-but kurang lebih  $1,3 \times 10^9$  kuman per milliliter (9).

Dari hasil percobaan yang pernah dikemukakan, ter-nyata ayam lebih resisten bila dibanding dengan kalkun bi-la sama sama dilakukan penularan dengan menggunakan kuman ganas melalui berbagai aplikasi. Akan tetapi ayam lebih rendah resistensinya dari pada kalkun bila keduanya sama sama diberi kuman avirulent terlebih dahulu kemudian baru ditulari dengan kuman ganas (5).

Atas kejadian ini pula, mungkin pemberian vaksin aktif pada kalkun dapat dipandang lebih efektif. Menurut Olson, pemberian vaksin aktif yang efektif pada kalkun bi-la kuman dalam vaksin tersebut berjumlah  $4 \times 10^8$  kuman de-ngan dicampur pada air minum. Mortalitas tidak tampak aki-bat pemberian dengan dosis  $4 \times 10^8$  kuman tersebut, bahkan telah dicoba melipatkan 40 x lipat dosis standard terse-but tanpa efek sampingan (18).

Penggunaan mutan *Pasteurella multocida streptom-*

cin-dependent pada kalkun dengan dosis  $3,75 \times 10^9$  kuman secara per oral atau parenteral dapat menghasilkan proteksi yang cukup baik (3).

### BAB III

#### MATERI DAN METODE

##### 1. Materi.

*Pasteurella multocida* yang digunakan pada percobaan ini berasal dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. *Pasteurella* tersebut dalam sifat-sifatnya adalah sebagai berikut : berbentuk batang pada pewarnaan methylene blue, non motil pada pemeriksaan natif dan bersifat Gram negatif. Pada blood agar dan tryptosa agar membentuk koloni transparant. Tidak tumbuh pada medium Mc. Conkey, methyl red test negatif, Voges Praskauer test negatif, indol test dan katalase test positif. Beberapa karbohidrat yang dapat difermentasi antara lain : fruktosa, galaktosa, glukosa, manitol, manosa, sukrosa, gliserol, sorbitol dan xylosa. Sebaliknya arabinosa, dextrin, dulcitol, inulin, laktosa, maltosa, raffinosa, rhamnosa, salicin dan trehalosa tidak difermentasikan.

Hewan percobaan ayam yang digunakan sebanyak 40 ekor, 20 ekor untuk percobaan daya *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dan 20 ekor untuk kontrol. Ayam percobaan yang digunakan adalah jenis White Leghorn umur lima bulan. Sebelumnya telah diketahui sejarahnya bahwa ayam-ayam pada peternakan tersebut belum pernah tereserang wabah Fowl cholera dan belum pernah di vaksinasi dengan vaksin Fowl cholera.

## 2. Metode kerja

### 2.1. Preparasi kuman hingga siap untuk disuntikkan.

*Pasteurella multocida* dalam bentuk kering beku di encerkan dengan 0,1 ml NaCl physiologis steril. Kuman dipupuk pada blood agar dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah tumbuh, koloni kuman diambil dengan ose, dipindahkan pada medium tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C 24 jam. Kuman yang tumbuh dipindahkan pada tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract (10 ml) dan diinkubasi 37°C selama 4 jam. Kuman diambil lalu dicentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 30 menit. Endapan hasil centrifuge dimasukkan kedalam tabung centrifuge yang berisi alpha-Naphthylamine 0,5 mg per ml dalam phosfat buffer pH 6 (5 ml) kemudian diinkubasi 37°C selama 15 menit. Kemudian kuman dalam tabung dicentrifuge kembali 2000 rpm selama 30 menit, endapan segera dicuci dengan tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract dua kali. Kemudian dilakukan lagi centrifuge, lalu dimasukkan dalam tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract (100 ml), kemudian diinkubasi satu malam (12 - 18 jam). Kuman dicentrifuge lagi dan endapan kuman dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract.

Setelah dilakukan preparasi seperti tersebut diatas kemudian kuman yang berasal dari tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract segera dipupuk pada medium



tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 100 mikrogram streptomycin per ml (medium tays), kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C 48 jam.

*Pasteurella multocida* yang tumbuh pada medium tays adalah *Pasteurella multocida* yang bersifat resisten terhadap streptomycin dan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent. Seleksi *Pasteurella multocida* streptomycin dependent dilakukan dengan menggunakan stempel beludru pada medium tays ke medium tays yang lain dan juga pada medium tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract tanpa streptomycin (medium tay).

*Pasteurella multocida* yang tumbuh pada medium tays dan medium tay adalah *Pasteurella multocida* yang resisten terhadap streptomycin. *Pasteurella multocida* yang tumbuh pada medium tays tetapi tidak tumbuh pada medium tay adalah *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent. Demikian seterusnya *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent tersebut dipupuk berulang kali pada medium tay dan medium tays sebagai kontrol untuk mengetahui bahwa *Pasteurella multocida* yang tumbuh tersebut banar-benar *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dan bukan *Pasteurella multocida* resisten terhadap streptomycin.

Dari koloni *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent yang dipupuk pada 10 ml tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 400 mikrogram streptomycin per ml, diinkubasikan 37°C 24 jam, lalu dicentrifuge 2000 rpm selama 30 menit, endapan dicuci dengan menggunakan NaCl physiologis steril. Ulangi centrifuge, supernatan di

buang dan kepada endapan ditambahkan NaCl physiologis ad volume semula sehingga didapat *Pasteurella multocida streptomycin-dependent* didalam NaCl physiologis. Tahap ini merupakan tahap akhir dari preparasi *Pasteurella multocida streptomycin-dependent* yang selanjutnya siap untuk disuntikkan pada hewan percobaan, dengan mengukur konsentrasi *Pasteurella multocida streptomycin-dependent* dalam NaCl physiologis. *Pasteurella multocida streptomycin-dependent* yang terdapat dalam larutan NaCl physiologis biakan kuman berumur 24 jam diukur dengan standard Mc. Farland. Dosis yang dikehendaki adalah Mc. Farland 3 yang telah diencerkan  $10^{-2}$ , dari hasil pengenceran ini diambil 0,1 ml untuk disuntikkan pada hewan percobaan.

*Pasteurella multocida streptomycin-dependent* dengan kepekatan Mc. Farland 1 diperkirakan konsentrasi kuman dalam suspensi tersebut adalah  $1,3 \times 10^9$  kuman per ml (9).

Mc. Farland 3 adalah  $3 \times 1,3 \times 10^9$  kuman per ml. Bila diencerkan  $10^{-2}$  maka akan menjadi  $3,9 \times 10^7$  kuman per ml, dari suspensi ini diambil 0,1 ml sehingga diperkirakan konsentrasi kuman dalam suspensi tersebut  $3,9 \times 10^6$  kuman.

Kuman ganas yang dipakai untuk challenge test adalah *Pasteurella multocida* biakan umur 18 jam yang disesuaikan dengan skala Mc. Farland 1 yang telah diencerkan  $10^{-4}$ . Dari hasil pengenceran ini diambil 0,1 ml, yang berarti konsentrasi kuman dalam suspensi tersebut kurang lebih  $1,3 \times 10^4$  kuman.

## 2.2. Suntikan pada hewan percobaan.

Penyuntikan dilakukan terhadap 20 ekor ayam dengan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent yang terdapat dalam larutan NaCl fisiologis. Ayam disuntik secara subcutan pada bagian leher.

Challenge test dilakukan 21 hari kemudian dengan menggunakan *Pasteurella multocida* ganas. Hewan percobaan yang dichallenge adalah ayam yang diberi pengebalan dengan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dan ayam kontrol. Challenge test tersebut dilakukan dengan cara penyuntikan secara intra muscular.

Selama melakukan percobaan, ayam-ayam tersebut dihindari pengaruhnya dari luar seminimal mungkin. Pemberian makanan dan minuman dilakukan secara teratur dua kali sehari pagi dan sore.

## 2.3. Isolasi kuman kembali.

Seksi terhadap ayam yang mati segera dilakukan untuk mengisolasi kembali *Pasteurella multocida* yang berasal dari jantung dan hepar, lalu dipupuk pada tryptosa agar plate. Kuman yang tumbuh pada perbenihan diambil dan diwarnai dengan methylene blue dan pewarnaan Gram. *Pasteurella multocida* yang diwarnai dengan methylene blue terlihat bipoler dan dengan pewarnaan Gram bersifat Gram negatif. Koloni yang terbentuk pada tryptosa agar plate berbentuk smooth dan mucoid.

Sebelum dilakukan uji biokimiawi, *Pasteurella multocida* yang berhasil diisolasi tersebut dicocokkan de

ngan stock *Pasteurella multocida* di laboratorium, baik morfologi secara mikroskopis maupun pupukan pada plate.

Pada uji biokimiawi *Pasteurella multocida* menunjukkan sifat yang sama seperti sebelum disuntikkan pada hewan percobaan.

BAB IV  
HASIL DAN PEMBAHASAN

TABEL I  
HASIL CHALLENGE TEST PADA WHITE LEGHORN YANG DIBERI MUTAN PASTEURELLA  
MULTOCIDA STREPTOMYCIN-DEPENDENT DAN KONTROL

GR	Agent untuk immunisasi	Jumlah H.P.	Dosis immunisasi dan aplikasi	Dosis Chal. dan aplikasi	Angka kematian										
					Hari kematian setelah challenge										
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	P.m.strep <sup>D</sup> .	20	$3,9 \times 10^6/sc$	$1,3 \times 10^4/im$	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
II	Kontrol	20	-	$1,3 \times 10^4/im$	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

H:P. = Hewan percobaan.

Chal = Challenge.

im = Intra muscular.

Sc = Subcutan.

P.m.strep<sup>D</sup>. = Pasteurella multocida streptomycin-dependent.

Setelah challenge test dengan menggunakan Pasteurella multocida ganas, hewan-hewan percobaan tersebut segera diamati. Pada hari pertama tidak ditemukan gejala klinis yang dicurigai atau kematian pada ayam yang telah diberi pengebalan dengan Pasteurella multocida streptomycin dependent. Kematian ditemukan sebanyak enam ekor pada ayam kontrol pada hari pertama tersebut dan sembilan ekor pada hari kedua.

Pada hari keempat, terjadi kematian tiga ekor pada ayam yang telah diberi pengebalan dengan Pasteurella multocida streptomycin-dependent. Ayam yang mati tersebut baik yang kontrol maupun bukan menunjukkan gejala klinis

yang sama. Gejala klinis yang berhasil diamati antara lain : faeces berwarna putih, cyanosis pada pial, kepala di<sub>u</sub>putar ke belakang (torticollis) serta anorexia.

Pada setiap ayam yang mati tersebut, diambil jantung dan heparnya untuk diisolasi kembali Pasteurella multocida.

Untuk mendapatkan suatu titik temu yang tepat dan dikaitkan dengan proteksi maupun keamanan dari suatu vaksin aktif masih merupakan suatu pekerjaan yang cukup sulit.

Berdasarkan pada kesulitan-kesulitan yang dialami untuk menentukan baik atau buruknya suatu vaksin, maka telah dikeluarkan suatu ketentuan didalam menilai suatu vaksin khususnya vaksin Fowl cholera (17).

Jika selisih prosentase hidup ayam yang divaksinasi dan prosentase hidup dari ayam kontrol setelah challenge test tidak kurang dari 60 %, maka vaksin Fowl cholera tersebut dapat dianggap memuaskan (17). Dengan demikian ketentuan tersebut dapat dijadikan sebagai suatu pedoman untuk menentukan kualitas dari pada vaksin Fowl cholera. Pada percobaan ini maka hasil adalah 60 %.

## BAB V

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil preparasi *Pasteurella multocida*, alpha-Naphthylamine dapat digunakan sebagai mutagen untuk memutasikan *Pasteurella multocida*, sebelum *Pasteurella multocida* tersebut diadaptasikan pada medium yang mengandung streptomycin. Setelah dilakukan pengamatan selama 21 hari, *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent yang disuntikkan pada hewan percobaan tidak menimbulkan efek sampingan.

Hasil challenge test secara intra muscular, beberapa ayam percobaan mampu menahan challenge, meskipun ada di antaranya yang mati. Dari hasil perhitungan, prosentase hidup ayam yang telah diberi pengebalan adalah 85 %, sedang prosentase hidup ayam kontrol adalah 25 %, jadi selisihnya adalah 60 %.

Sesuai dengan pedoman pengukuran kualitas vaksin Fowl cholera (17), maka *Pasteurella multocida* streptomycin dependent dengan dosis  $3,9 \times 10^6$  kuman dapat digunakan sebagai bahan vaksin.

Dalam usaha melindungi ayam dari wabah Fowl cholera dengan cara vaksinasi, khususnya vaksin yang menggunakan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent, masih perlu diadakan penelitian lebih lanjut. Atas dasar itu maka disarankan agar diadakan penelitian lebih mendalam. Terutama ditujukan terhadap dosis, aplikasi, maupun kapan dapat dilakukan vaksinasi secara tepat, kemudian menulari kuman ganas dengan berbagai cara.

Prosedure-prosedure yang telah dikemukakan oleh penulis, selain tidak praktis, secara ekonomis kurang menguntungkan. Maka penulis beranggapan, bahwa masih perlu dilakukan penelitian yang berkaitan dengan segi kepraktisan dan faktor ekonomis tersebut, serta waktu atau musim yang tepat.



BAB VI  
RINGKASAN

*Pasteurella multocida* yang sensitif terhadap streptomycin diberi zat mutagen berupa alpha-Naphthylamine dengan konsentrasi 0,5 mg per ml dalam fosfat buffer pH 6, kemudian diadaptasikan pada medium yang mengandung streptomycin, hingga diperoleh *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent. Dengan menggunakan stempel beludru yang telah disterilkan terlebih dahulu, dapat dipisahkan koloni *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dari strain yang resisten terhadap streptomycin.

Mutan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent tersebut disuntikkan pada hewan percobaan, sebanyak  $3,9 \times 10^6$  kuman biakan umur 24 jam (Mc. Farland 3 yang telah diencerkan  $10^{-2}$  diambil 0,1 ml) secara subcutan. Sedang kuman ganas yang dipakai untuk challenge test adalah *Pasteurella multocida* biakan umur 18 jam sebanyak  $1,3 \times 10^4$  kuman (Mc. Farland 1 diencerkan  $10^{-4}$  diambil 0,1 ml), disuntikkan secara intra muscular.

Hewan percobaan ayam yang digunakan sebanyak 40 ekor, 20 ekor untuk percobaan daya *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dan 20 ekor untuk kontrol. Challenge test dilakukan 21 hari kemudian pada seluruh hewan percobaan tersebut.

Setelah challenge test, hewan-hewan percobaan tersebut segera diamati, pada hari pertama tidak ditemukan kematian pada ayam yang telah diberi pengebalan de -

ngan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent. Kematian ditemukan sebanyak enam ekor pada ayam kontrol pada hari pertama tersebut dan sembilan ekor pada hari kedua. Pada hari keempat, terjadi kematian tiga ekor pada ayam yang telah diberi pengebalan dengan *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent.

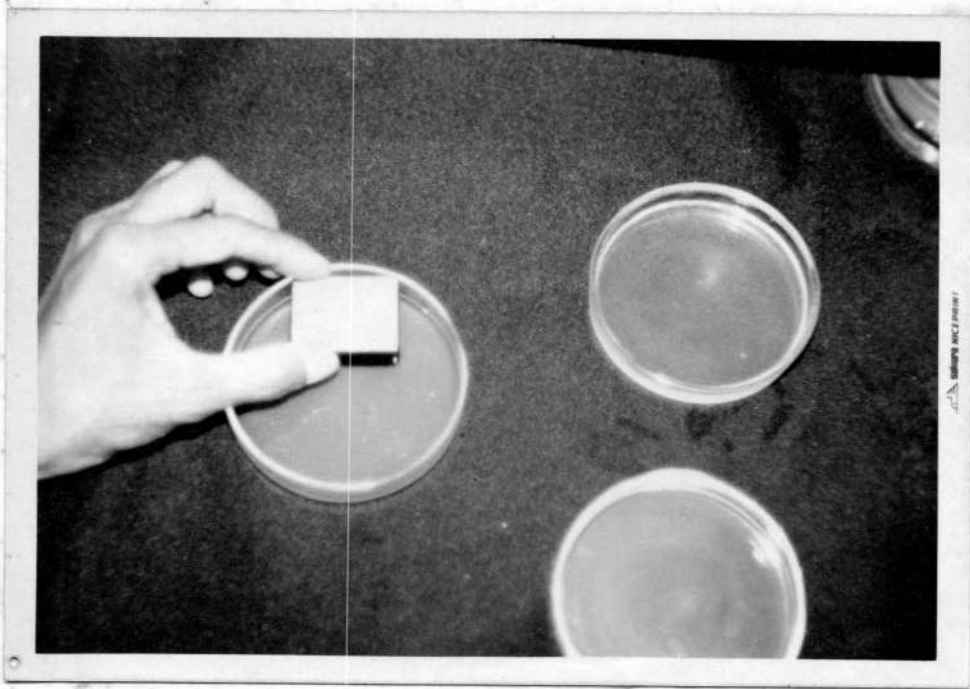
Dari ayam yang mati tersebut, dapat diisolasi kembali *Pasteurella multocida* yang berasal dari jantung dan hepar.



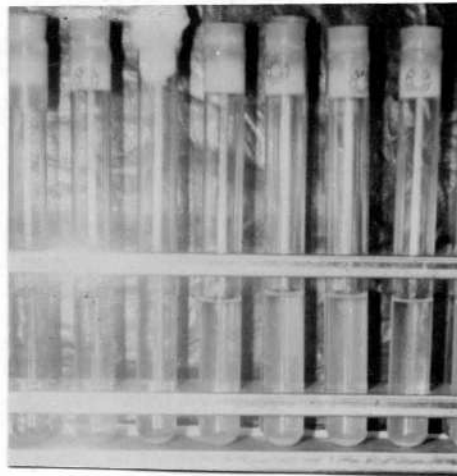
Gambar 1. Pembuatan medium tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract dan streptomycin ( medium tays ).



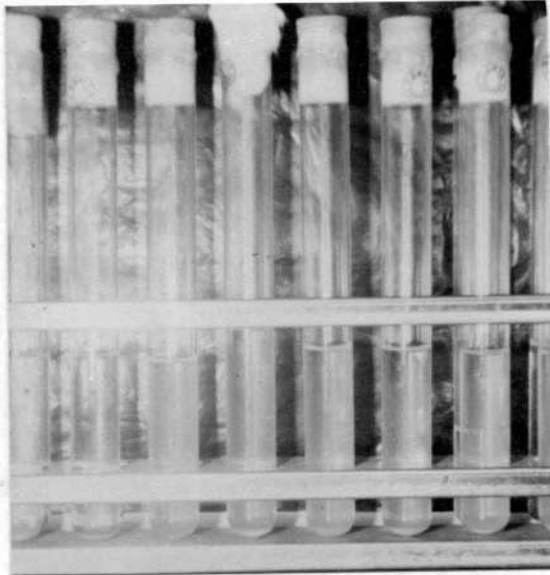
Gambar 2. Stempel beludru, untuk memindahkan kuman pada plate.



Gambar 3. Memindahkan kuman dari medium tays ke medium tays yang lain dan medium tay.



Gambar 4. *Pasteurella multocida* streptomycin-dependent dalam larutan NaCl fisiologis biakan kuman umur 24 jam diukur dengan standard Mc. Farland 3, dipakai sebagai bahan vaksin.



Gambar 5. *Pasteurella multocida* dalam larutan NaCl fisiologis biakan kuman umur 18 jam diukur dengan standard Mc. Farland 4, sebelum dijadikan Mc. Farland 1, dipakai untuk challenge test



Gambar 6. Ayam mati setelah dichallenge dengan kuman ganas.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Biester, H.E. and L.H. Schwarte. 1965. Diseases of Poultry. 5<sup>th</sup>.Ed. The Iowa University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 359 - 370.
2. Chengapa, M.M., G.R. Carter. 1979. Proved Method for Obtaining Streptomycin-Dependent Mutants from *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*, Using N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. Am. J. Vet. Res. 40 : 449 - 450.
3. Chengapa, M.M., G.R. Carter, T.S. Chang. 1979. A Streptomycin-Dependent Live *Pasteurella multocida* Type-3 Vaccine for The Prevention of Fowl Cholera in Turkeys. Avian Dis. 23 : 57 - 61.
4. Cruicksank, R., J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain. 1975. Medical Microbiology. 12<sup>th</sup>.Ed. Churchill Livingstone, Edinburg, London and New York. p. 182.
5. Darieux, W.T. 1978. Response of Young Chickens and Turkeys to Virulent and Avirulent *Pasteurella multocida* Administered by Various Routes. Avian Dis 22 :
6. Dorsey, T.A. 1963. Studies on Fowl Cholera III. The Correlation Between Biochemic Classification and The Serologic and Immunologic Nature of Avian *Pasteurella multocida* Strain. Avian Dis. 7 : 392 - 402.

7. Dupont, H.L., R.B. Hornick, M.J. Snider., et al. 1972. Immunity in Shigellosis I. Response of Man to Attenuated Strain of Shigella. J. Inf. Dis. 125 : 5 - 11.
8. Gorini, L., R. Rosset and R.A. Zimmerman. 1967. Phenotypic Masking and Streptomycin-Dependence. Science 157 : 1314.
9. Heddleston, L., L Kenneth and R.C. Reisinger. 1959. Studies on Pasteurellosis III. Control of Experiment Fowl Cholera in Chickens and Turkeys With An Emulsified Killed Vaccine. Avian Dis. 3 : 397 - 404.
10. Hitchner, S.B., Chairman, C.H. Domermuth, H.G. Purchase, J.E. Williams. 1975. Isolation and Identification of Avian Pathogens. Arnold Printing Corporation, Ithaca, New York. p. 38 - 51.
11. Hungerford, T.G. 1969. Diseases of Poultry. 4<sup>th</sup>.Ed. Angus and Robertson, Sydney, London, Melbourne. p. 286 - 298.
12. Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg. 1980. Review of Medical Microbiology. 14<sup>th</sup>.Ed., Lange Medical Publication, Drawer, L, Los Altos, California 9402. p. 41 - 59.
13. Joklik, Willet, Amos. 1980. Zinsser Microbiology. 17<sup>th</sup>.Ed. Appleton - Century - Crofts New York, U.S.A. p. 175 - 256.

14. Lederberg, J., E.M. Lederberg. 1952. Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. *J. Bacteriol.* 63 : 399 - 406.
15. Maheswaran, S.K., J.R. Mc. Dowel, B.S. Pomeroy. 1973. Studies on *Pasteurella multocida*. I. Efficacy of an avirulent mutant as a live vaccine in turkeys. *Avian Dis.* 3 : 397 - 404.
16. Merchant, I.A. and R.A. Packer. 1963. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 6<sup>th</sup>.Ed. Iowa state University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 413 - 433.
17. National Research Council. 1971. Methods for Examining Poultry Biologic and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens. National Academy of Sciences, Washington D.C. p. 399 - 406.
18. Olson, L.D. 1977. Evaluation of Two Avirulent Vaccines for Preventing Experimental Fowl Cholera in Turkeys, and Use of One Vaccine in The Field. *Avian Dis.* 21 : 178 - 184.
19. Pratt, W.B. 1977. *Chemotherapy of Infection*. 1<sup>st</sup>.Ed. Oxford University Press, U.S.A. p. 98 - 99.
20. Reitman, M. 1967. Infectivity and Antigenicity of Streptomycin-dependent *Salmonella typhosa*. *J. Inf. Dis.* 117 : 101 - 107.
21. Sadik, A. dan Soelistyanto. 1979. Penggunaan Vaksin Cholera Ayam Bentuk Oil Adjuvant dan Suspensi. *Bulletin Vetma No.1.* hal. 21 - 31.



22. Sinha, V.B. and J.W. Bhattacharjee. 1976. A Streptomycin Revertant of A Streptomycin-Dependent Strain of *Vibrio Cholera*. *Wrld. Hlth. Org. Bull.* 53. p. 482 - 483.
23. Volk, W.A. 1978. *Essentials of Medical Microbiology*. 1<sup>st</sup>.Ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia - New York - San Jose - Toronto. p. 90.
24. Wei, B.D. and G.R. Carter. 1978. Live Streptomycin - Dependent *Pasteurella multocida* Vaccine for The Prevention of Hemorrhagic Septicemia. *Am. J. Vet. Res.* 39 : 1534 - 1536.
25. Whitlow, K.J. and W.J. Polgase. 1975. Regulation of Acetohydroxy Acid Synthase in Streptomycin-Dependent *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 121 : 9 - 12.

Lampiran

1. Pembuatan medium tryptosa agar yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 100 mikrogram streptomycin per ml.

Bacto tryptosa	20 gram
Bacto dextrosa	1 gram
Sodium chloride	5 gram
Bacto agar	15 gram
Yeast extract	3 gram
Streptomycin sulfat ("Meiji")	100 milligram
Aquadest ad	1000 milliliter

2. Pembuatan medium tryptosa broth yang mengandung 0,3 % yeast extract dan 400 microgram streptomycin per ml.

Bacto tryptosa	20 gram
Bacto dextrosa	2 gram
Sodium chloride	5 gram
Streptomycin sulfat ("Meiji")	400 milligram
Aquadest ad	1000 milliliter

3. Pembuatan alpha-Naphthylamine dalam phosfat buffer pH 6 dengan konsentrasi 0,5 mg per ml.

alpha-Naphthylamine	50 milligram
Phosfat buffer pH 6	100 milliliter