

## PATOGENISITAS ISOLAT *Escherichia coli* POSITIF CONGO RED PADA TELUR AYAM BEREMBRIO UMUR 12 HARI

### PATOGENICITY OF CONGO RED POSITIVE ISOLATE OF *Escherichia coli* IN THE 12-DAYS OLD CHICKEN EMBRYOS

Widagdo Sri Nugroho<sup>1</sup>, M Haryadi Wibowo<sup>2</sup> dan Widya Asmara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, <sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit II Yogyakarta 55281 Phone/Fax: 0274-563083

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenisitas isolat *Escherichia coli* positif *congo red*. *Escherichia coli* dari kasus kolibasilosis ayam diisolasi menggunakan media TSA dan EMB kemudian kemampuan pengikatan warna *congo red* diuji dengan agar *congo red* (TSA+0,003% *congo red*). Tingkat patogenisitas isolat yang mengikat warna *congo red* dilihat dari uji kematian embrio. Empat isolat *E.coli* positif *congo red* (CR+) dan 1 isolat negatif terhadap *congo red* (CR-) diinokulasikan pada telur berembrio umur 12 hari. Tingkat kematian embrio selama enam hari pascainokulasi masing-masing isolat *E.coli* positif *congo red* (500 colony form unit / CFU) pada kantung alantois telur berembrio umur 12 hari berbeda antar kelompok. Angka kematian yang diperoleh dari isolat CR + 1, 2, 3, dan 4 masing-masing adalah 10%, 20%, 60% dan 100%. Perubahan anatomi yang tampak yaitu terjadinya perdarahan kulit pada embrio yang mati dan secara mikroskopik lesi-lesi pada hati, jantung, dan limpa menunjukkan adanya septisemi. Isolasi dan uji ulang *congo red* terhadap inokulat positif *congo red* memperlihatkan bahwa beberapa isolat kehilangan kemampuan mengikat warna *congo red*. Isolat-isolat tersebut memiliki angka kematian yang rendah (10–20%). Variasi kemampuan isolat mengikat warna *congo red* memiliki keterkaitan dengan patogenisitasnya.

**Kata kunci:** *Escherichia coli*, *congo red*, patogenisitas.

#### ABSTRACT

The aim of this study is to know the pathogenicity of *congo red* positive isolate of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* from avian colibacillosis were isolated by TSA and EMB then their ability to bind *congo red* dye were tested by *congo red* agar (TSA+0.003% *congo red*). Isolates that have ability to bind *congo red* dye were observed their pathogenicity by chicken embryonic lethality assay. Four isolates positive *congo red* (CR+) and an isolate negative *congo red* (CR-) were inoculated to 12-days-old embryos. Six days after inoculation of each CR+ isolates group (500 CFU) into the allantoic cavity of 12-day-old embryos produced different mortality rates among groups. The mortality rate of each CR+ isolate groups 1, 2, 3, and 4 were 10%, 20%, 60%, and 100%. Pathology observation showed that dead embryos have skin hemorrhage and microscopic examination of liver, heart, and spleen indicated septicemic infection. Reisolated and retested bacteria by *congo red* agar produced some isolates that lost their ability to bind *congo red* dye and these isolates had low embryonic mortality (10-20%). Variety isolate ability to bind *congo red* has relation with their pathogenicity.

**Key words:** *Escherichia coli*, *congo red*, pathogenicity.

## PENDAHULUAN

Kejadian kolibasilosis pada ayam terjadi di seluruh dunia dan dapat menyerang semua umur terutama hewan muda. Kasus kompleks dan bersifat sistemik pada ayam petelur dapat menyebabkan kematian khususnya pada awal periode produksi. Telur yang terinfeksi dapat mengalami toksemia dan mati selama masa penetasan atau umur-umur awal (Leeson & Summers, 2000). Kasus infeksi akut pada ayam muda dapat terjadi tanpa lesi yang jelas dan hanya tampak pembengkakan dan hiperemi pada hati dan limpa serta diikuti peningkatan cairan dalam peritoneum. Perubahan pascamati yang sering terlihat adalah radang kantung hawa, usus, indung telur, selaput jantung, dan tali pusat (Whiteman & Bickford, 1989; Akosa, 1993). Radang sendi kaki dapat terjadi pada kasus yang bersifat septisemi (Berkhoff & Vinal, 1985). Infeksi pada indung dan saluran telur dapat mengakibatkan radang peritoneum akibat pecahnya telur di dalam tubuh (*yolk peritonitis*) (Leeson & Summers, 2000).

Peneguhan diagnosis kolibasilosis dilakukan dengan isolasi dan identifikasi bakteri dari lesi organ penderita. Prosedur umum yang sering dikerjakan dengan menggunakan media selektif seperti EMB, Mac Conkey, uji gula-gula (TSI) dan penelusuran serotipe untuk mengetahui galur bakteri (Jang dkk, 1978). Penggunaan media *congo red* oleh Berkhoff & Vinal (1985) dilakukan untuk mengetahui sifat patogenisitas bakteri. Isolat yang bereaksi positif terhadap *congo red* (CR+) menyebabkan ayam mengalami kolibasilosis dan isolat tersebut dapat diisolasi ulang, sementara pada isolat yang tidak mengikat *congo red* (CR-) tidak dapat diisolasi ulang. Hal ini mengindikasikan bahwa pengikatan *congo red* oleh isolat dapat digunakan sebagai penanda fenotip untuk membedakan isolat invasif dan noninvasif. Hal ini diperkuat oleh Gjessing & Berkhoff (1988) yang menyatakan bahwa ada korelasi yang kuat antara ekspresi penotip *E.coli* pada media *congo red* dengan sifat virulensinya.

Pengujian patogenisitas isolat *E.coli* patogen dilakukan oleh Wooley dkk (2000) dengan menginokulasikan isolat ke telur ayam berembrio umur 12 hari. Abnormalitas secara mikroskopik dapat diamati pada embrio yang diinfeksi isolat patogen. Sifat fenotip berasosiasi dengan berbagai faktor yang mempengaruhi patogenisitasnya dan tingkat kematian embrio dapat digunakan sebagai pembeda patogenisitas bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenisitas isolat *E.coli* positif *congo red* pada telur ayam berembrio umur 12 hari. Pengamatan dilakukan terhadap kemampuan isolat bakteri mengikat warna *congo red* dan mortalitas embrio yang ditimbulkan.

## MATERI DAN METODE

Materi penelitian ini menggunakan 4 isolat *Escherichia coli* positif *congo red* (CR+) dan 1 isolat CR-, media isolasi dan identifikasi (trypticase soy agar, eosin methylene blue agar, dan *congo red* agar (TSA + 0,003% *congo red*), hewan percobaan yaitu telur ayam berembrio umur 12 hari dan bahan-bahan kimia (phosphat buffer saline 0,7%, alkohol 70%). Peralatan yang diperlukan adalah inkubator suhu, cawan petri, gunting dan pinset, spuit, inkubator penetasan. Isolat *Escherichia coli* diisolasi dari ayam pedaging atau petelur yang menderita kolibasilosis. Sampel bakteri dibiakkan pada TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni *E. coli* yang tumbuh akan berwarna krem, mukoid, dan sirkuler. Koloni tersebut kemudian dibiakkan pada media EMB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni *E. coli* pada media EMB akan tampak berwarna hijau metalik (*green-black metallic sheen*). Koloni yang tumbuh kemudian ditanam pada media *congo red* dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam selanjutnya media *congo red* didiamkan pada suhu kamar selama 48 jam. Koloni bakteri yang mengikat *congo red* (CR+) akan berwarna merah dan koloni yang tidak mengikat *congo red* (CR-) akan berwarna putih. Masing-masing isolat kemudian dimurnikan dan dipisahkan untuk dibuat inokulat.

Inokulat *E.coli* CR+ dan CR- disiapkan secara terpisah, dilakukan pengenceran berjenjang menggunakan PBS 0,7% steril sebanyak 5 kali hingga diperoleh pengenceran 10<sup>5</sup>. Pada tabung terakhir, suspensi dibiakkan untuk penghitungan koloni (*colony form unit* /CFU). Angka yang diperoleh digunakan sebagai pedoman dosis inokulat yang akan diinfeksi. Dosis yang diinfeksi adalah 0,1 ml (500 CFU) (Wooley dkk, 2000).

Pengujian patogenisitas dilakukan terhadap telur ayam berembrio (TAB) umur 12 hari yang terbagi menjadi 7 kelompok masing-masing terdiri 10 butir TAB. Kelompok satu diinokulasi dengan isolat 1 CR +, kelompok 2 dengan isolat 2 CR +, kelompok 3 dengan isolat 3 CR +, kelompok 4 diinokulasi dengan isolat 4 CR+, kelompok 5 diinokulasi dengan isolat 5 CR -, kelompok 6 diinokulasi dengan PBS 0,7%, dan kelompok 7 tidak diinokulasi

Pengamatan pascainokulasi TAB dilakukan selama 6 hari (sampai umur 18 hari), kematian embrio pada setiap kelompok dicatat dan dilakukan nekropsi untuk melihat adanya perubahan patologis pada hati, jantung, dan limpa. Isolasi dan uji *congo red* ulang dilakukan pada organ hati dan jantung yang mengalami erubahan dan diamati histopatologinya.

Data yang diperoleh berupa angka kematian embrio, perubahan organ, dan jumlah isolat yang dapat diisolasi ulang dari embrio, dianalisis secara kualitatif dan deskriptif.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi isolat *E. coli* yang diisolasi dari organ penderita kasus kolibasilosis, sejumlah 5 sampel. Empat isolat bereaksi positif (CR+) terhadap *congo red* dan 1 isolat tidak mengikat warna *congo red* (CR-). Setelah diinokulasi dan dilakukan uji ulang, diperoleh hasil seperti dalam Tabel 1. Isolat yang bersifat patogen mampu mengikat warna *congo red* media (Gambar 1).

Tabel 1. Hasil uji ulang isolat terhadap media *congo red*

Kelompok	Uji CR I	Uji ulang CR	%
Isolat 1	+	+ 6/10	60
Isolat 2	+	+ 4/10	40
Isolat 3	+	+ 3/10	30
Isolat 4	+	+ 10/10	100
Isolat 5	-	-	0
PBS			0
Kontrol			0

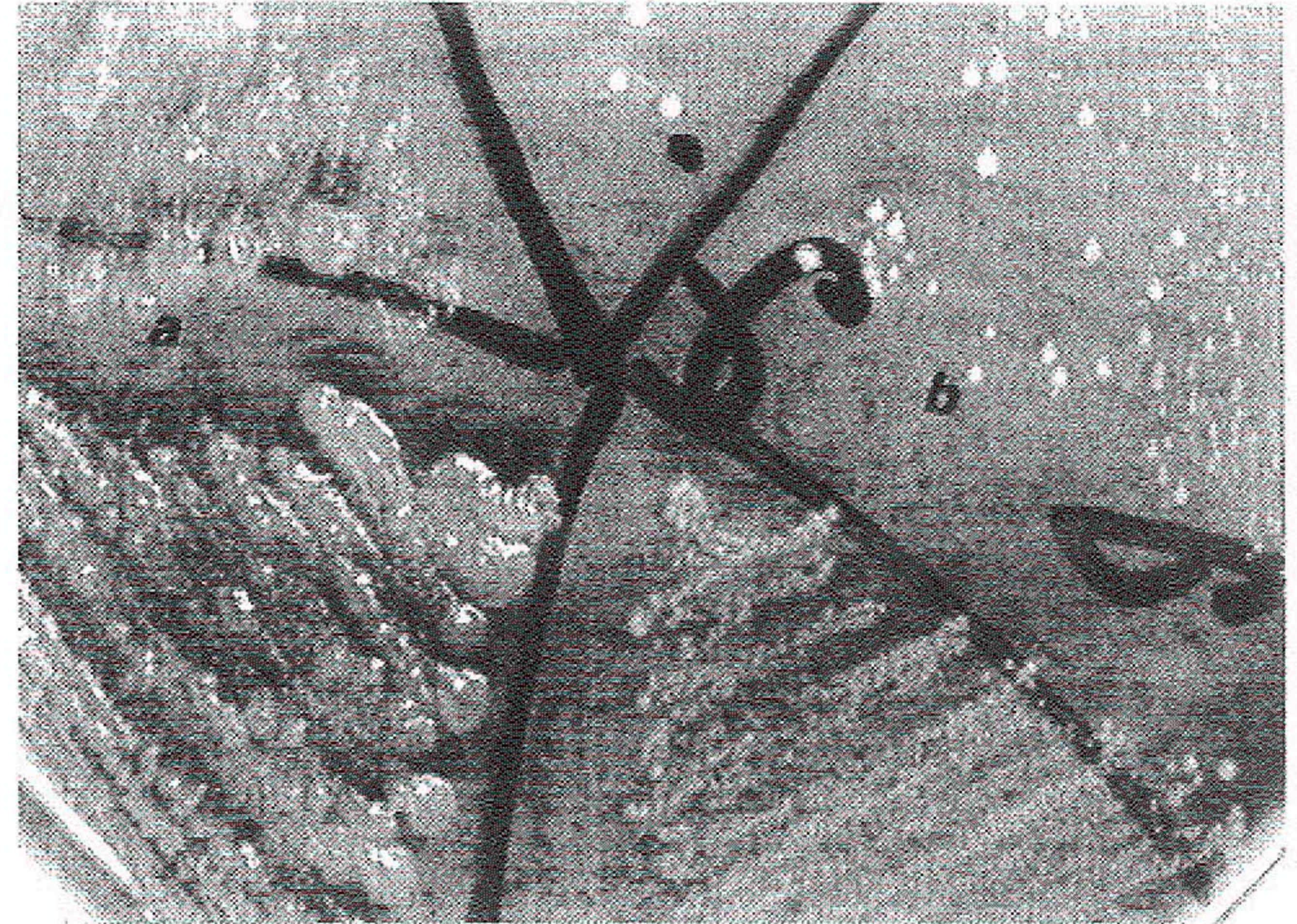
Isolat 1, 2, 3, dan 4 memberi reaksi positif terhadap media *congo red* yaitu dengan mengikat warna *congo red*. Satu isolat (isolat 5) tampak berwarna putih yang berarti tidak mampu mengikat warna *congo red*.

Reaksi pengikatan warna *congo red* tampak setelah diinkubasi 24 jam dan semakin jelas setelah 48 jam diinkubasi pada suhu kamar. Pengikatan warna ini akan terjadi pada semua koloni yang ada setelah 4 hari, sehingga pengujian dengan media ini lebih tepat dilakukan sampai 48-72 jam setelah inkubasi.

Karakter pengikatan warna *congo red* cukup stabil, mudah dikerjakan, dan merupakan pembeda fenotip yang mudah dikenali. Kestabilan pengikatan CR dari beberapa isolat lebih besar dari yang lain, hal ini berjalan paralel dengan tingkat patogenisitas bakteri. Secara umum kemampuan pengikatan warna

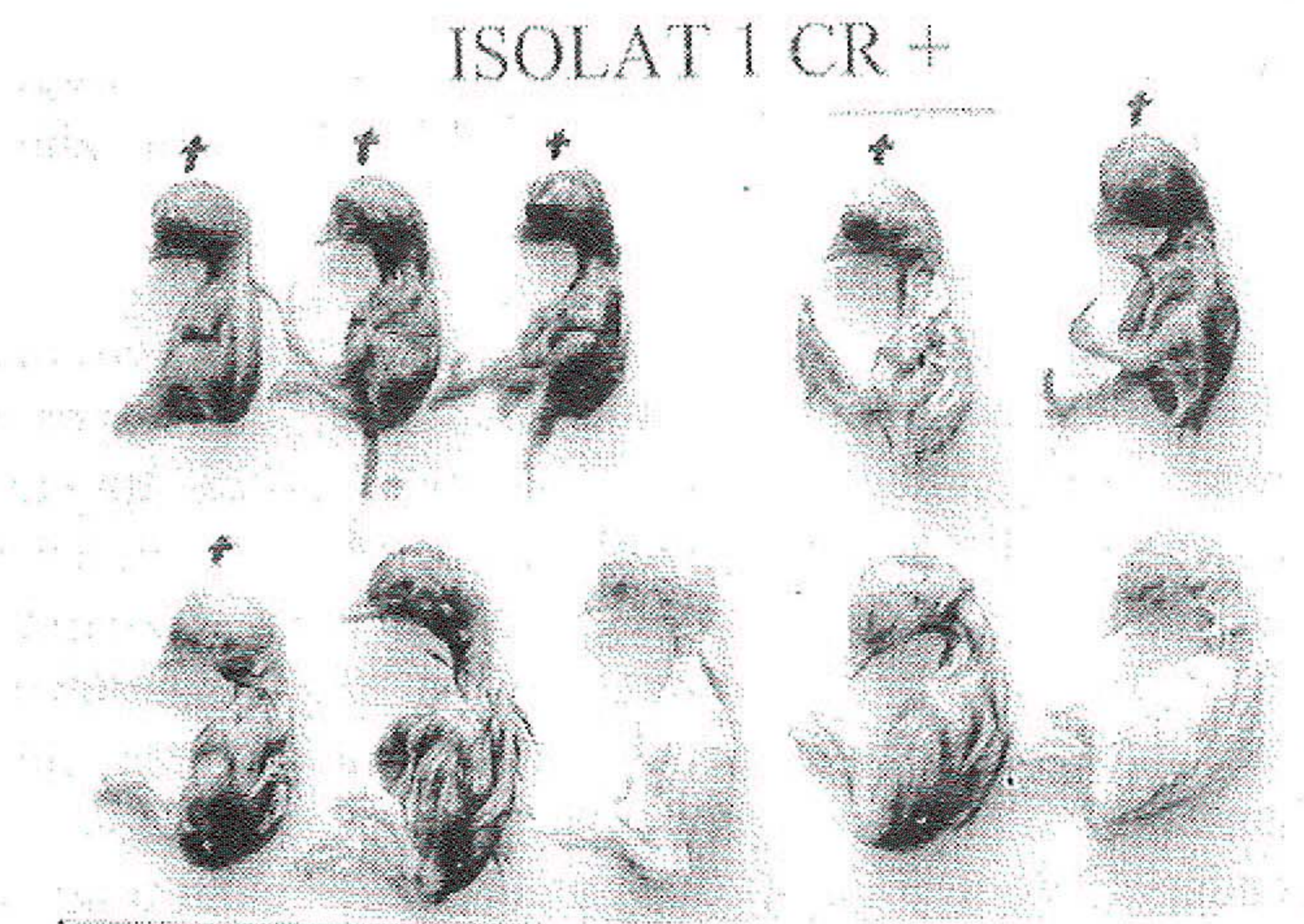
CR menurun atau hilang apabila isolat disubkulturkan pada media yang kompleks (seperti agar darah). Isolat CR - mutan secara spontan dapat muncul dari isolat induk yang CR + (Berkhoff dan Vinal, 1985).

Kondisi ini tampak pula pada Tabel 1, dari beberapa



Gambar 1. Hasil uji isolat pada agar *congo red*. a. Isolat yang mengikat warna *congo red* b. Isolat yang tidak mengikat warna *congo red*.

isolat CR + ternyata tidak semuanya dapat menghasilkan isolat CR + lagi (isolat 1, 2, dan 3). Fenomena perubahan karakter ini masih belum diketahui secara pasti, diduga hal ini berasosiasi dengan keberadaan  $\beta$ -D-glucan pada dinding bakteri (Berkhoff dan Vinal, 1985).



Gambar 2. Perdarahan kulit pada embrio mati yang diinfeksi isolat CR +

Angka kematian embrio dapat digunakan untuk menghubungkan antara perubahan sifat

pengikatan isolat terhadap warna *congo red* dengan sifat patogenisitas isolat. Sifat yang berubah terhadap pengikatan warna CR ini terjadi pada isolat-isolat dengan angka kematian embrio yang rendah, seperti tampak dalam Tabel 2. Sementara pada isolat CR – yang tidak menghasilkan kematian embrio sampai pengamatan berakhir tetap menunjukkan hasil CR – pada uji ulangnya.

Berdasarkan hal ini maka patogenisitas *E.coli* dapat dikelompokkan sebagai virulen (>29%), moderat atau patogen sekunder (10-29%) dan avirulen (<10%) ( Wooley dkk , 2000). Perubahan sifat isolat terhadap pengikatan warna CR ini sejalan dengan

reaksi peradangan pada semua organ tersebut. Keadaan itu menggambarkan adanya infeksi sistemik, bakteri yang diinokulasikan pada ruang alantois, masuk ke dalam tubuh embrio dan beredar di seluruh tubuh. Gjessing dan Berkhoff (1988) menggambarkan lesi-lesi akibat infeksi *E.coli* ini adalah radang kantung hawa, radang hati, dan radang selaput jantung.

Media *congo red* dapat digunakan sebagai media untuk identifikasi sifat patogen *E.coli*. Tingkat patogenitas *E.coli* berkaitan dengan kemampuan bakteri mengikat warna *congo red*. Pengujian sensitifitas dan spesifisitas media *congo red* perlu dilakukan sehingga ketepatan uji dapat diketahui.

Tabel 2. Angka kematian embrio setelah diinokulasi

Kelompok	Uji CR	Kematian embrio pada hari ke-n						Total	%
		1	2	3	4	5	6		
Isolat 1	+	2	2	0	0	1	1	6	60
Isolat 2	+	1	0	0	0	0	0	1	10
Isolat 3	+	1	1	0	0	0	0	2	20
Isolat 4	+	6	2	2	-	-	-	10	100
Isolat 5	-	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS		0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol		0	0	0	0	0	0	0	0

tingkat patogenisitasnya. Gjessing dan Berkhoff (1988) menegaskan bahwa antara ekspresi fenotip CR dengan virulensi *E.coli* pada ayam memiliki korelasi yang kuat.

Perbedaan yang jelas antara isolat CR+, CR-, PBS 0,7%, dan kontrol, menggambarkan variasi sifat patogen *E.coli*. Patogenisitas pada embrio yang sangat nyata adalah kematian embrio dan perubahan patologinya.

Kematian embrio pada hari pertama pascainokulasi menunjukkan ketidakmampuan embrio dalam menghadapi infeksi bakteri. Variasi tingkat kematian ini menggambarkan perbedaan potensi patogen dari masing-masing isolat. Total kematian embrio selama 6 hari menghasilkan angka kematian yang dapat digunakan sebagai indikator patogenisitas diantara isolat-isolat yang patogen sesuai dengan pendapat Wooley dkk (2000) yang menyatakan tingkat kematian embrio dapat digunakan sebagai pembeda sifat patogenisitas.

Perubahan patologi yang nyata adalah terjadinya perdarahan kulit pada embrio yang mati (Gambar 2 ). Perubahan mikroskopik dari hati dan jantung dari embrio yang mati tampak menunjukkan

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Lembaga penelitian UGM dengan anggaran rutin MAK 5250 tahun anggaran 2001

## DAFTAR PUSTAKA

- Akosa, B.T., 1989. Manual Kesehatan Unggas cetakan pertama, percetakan Kanisius, Yogyakarta hal : 48-50
- Berkhoff, H.A., & A.C.Vinal, 1985. Congo Red Medium to Distinguish Between Invasive and Non Invasive *Escherichia coli* Pathogenic for Poultry, Avian diseases Vol 30 No. 1, pp: 117-121
- Gjessing, K.M., & H.A. Berkhoff, 1988. Experimental Reproduction of Airsacculitis and Septicemia by Aerosol Exposure of 1-Day-Old chicks Using Congo Red Positive

- Escherichia coli*, Avian Diseases Vol. 30 No.6 pp: 473-478
- Jang, S.S., E.L. Biberstein, & D.C. Hirsh, 1978. A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Mycology, pp: 15,88,99
- Leeson, S., & D. Summers, 2000. Broiler Breeder Production, University Books Guelph, Ontario, Canada, p 131
- Whiteman, C.E., & A.A. Bickford, 1989. Avian Disease Manual, 3<sup>rd</sup> ed. American Association of Avian Pathologist, pp 77-81.
- Wooley, R.E., P.S. Gobbs, T.P. Brown, & J.J. Maurer, 2000. Chicken Embryo Lethality Assay of Determining The Virulence of Avian *Escherichia coli* Isolates, Avian Diseases 44: 318-324.