

## Karakteristik Patogenitas *Avibacterium paragallinarum* Isolat Lapang pada Telur Ayam Berembrio umur 7 hari

### *Characteristics Pathogenicity of Avibacterium paragallinarum Field Isolate in Embryonic Chicken Eggs Aged 7 Days*

Lynda Nugrahaning I.<sup>1</sup>, Sruti Listra A.<sup>2</sup>, Ima Fauziah<sup>3</sup>, Vinsa Cantya P.<sup>4</sup>, Sitarina Widyarini<sup>5</sup>, A.E.T.H. Wahyuni<sup>6\*</sup>

<sup>1,2,3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>4</sup>Asisten Riset Profesor, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

<sup>5</sup>Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>6</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*Corresponding Author; Email: wahyuni\_aeth@ugm.ac.id

Naskah diterima: 31 Mei 2019, direvisi: 16 Agustus 2020, disetujui: 20 Oktober 2020

#### Abstract

Infectious coryza (IC) is a bacterial disease that attacks the chicken's respiratory tract, which can be acute to chronic. IC caused by *Avibacterium paragallinarum*. IC damage the upper respiratory tract, especially the nasal cavity. Observation of macroscopic changes in embryos that have died after inoculation in specific pathogen free (SPF) embryonic chicken eggs (ECE) as one of the characteristics of *A. paragallinarum* isolates has not been widely performed. This study aims to determine the characteristics of *A. paragallinarum* isolates through inoculation on embryonic chicken eggs aged 7 days. The 50 SPF ECE 7-day divided into 5 groups, each consisting of 10 eggs, namely the negative control group, inoculated *A. paragallinarum* serotype A/221; B/Spross; B/2448; and C/2447. The bacteria are first cultured in broth media and incubated for 24 hours at 37°C. Volume of bacteria suspense 0,2 ml ( $6 \times 10^8$  cfu/ml) was injected into the SPF ECE, incubated at 37°C and observed 2 times a day. The dead embryo was scoring macroscopic changes. Embryo from SPF ECE in the inoculated group *A. paragallinarum* serotype A/221, B/Spross, B/2448, and C/2447 100% showed hemorrhage on head and body All *A. paragallinarum* isolates were pathogenic in embryonic chicken eggs.

**Key words :** *Avibacterium paragallinarum*; embryonic chicken eggs; inoculation

#### Abstrak

*Infectious coryza* (IC) adalah penyakit bakterial yang menyerang saluran pernapasan ayam, yang dapat bersifat akut sampai kronis disebabkan oleh *Avibacterium paragallinarum*. IC merusak saluran pernapasan bagian atas, terutama rongga hidung. Pengamatan perubahan makroskopik pada embrio yang mengalami kematian setelah inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) sebagai salah satu karakteristik isolat *A. paragallinarum* belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat *A. paragallinarum* melalui inokulasi pada telur ayam berembrio TAB SPF umur 7 hari. TAB SPF umur 7 hari berjumlah 50 butir dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 10 butir yaitu kelompok kontrol negatif, *A. paragallinarum* serotipe A/221; serotipe B/Spross; serotipe B/2448; dan serotipe C/2447. Bakteri terlebih dahulu dikultur pada media cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri dengan volume 0,2 ml ( $6 \times 10^8$  cfu/ml) diinjeksikan pada TAB SPF, diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati adanya kematian sebanyak 2 kali sehari. Embrio yang mati dilakukan skoring perubahan makroskopik. Embrio yang berasal dari TAB SPF pada kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe A/ 221, B/Spross, B/2448, and C/2447 mengalami hemoragi pada bagian kepala dan tubuh. Keseluruhan isolat *A. paragallinarum* bersifat patogen pada telur ayam berembrio.

**Kata kunci:** *Avibacterium paragallinarum*; inokulasi; telur ayam berembrio; inokulasi

## Pendahuluan

*Snot* atau *infectious coryza* (IC) adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh *Avibacterium paragallinarum*, menyerang saluran pernapasan ayam, dan dapat bersifat akut sampai kronis. *Snot* merusak saluran pernapasan bagian atas, terutama rongga hidung (Blackall dan Soriano-Vargas, 2013; Patil et al., 2016). Penyakit ini memiliki tingkat mortalitas yang rendah. IC pada ayam petelur menyerang semua umur. Jika terinfeksi pada masa menjelang bertelur, kelompok ayam ini akan sangat terlambat produksinya serta penurunan produksi telur mulai dari 10% sampai dengan 40% (Akter et al., 2014; Ali et al., 2013) serta menyebabkan terjadinya peningkatan angka afkir pada ayam petelur betina (Gong et al., 2014).

Isolat *A. paragallinarum* dilakukan peningkatan patogenesitas dengan cara menginokulasikan pada *yolk sac* telur ayam berembrio (TAB) umur 7 hari pernah dilakukan oleh Blackall (1995) dan Takagi et al. (1991). TAB yang telah diinokulasi dengan *A. paragallinarum* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Adanya kematian embrio dalam waktu 24 jam setelah inokulasi serta hemoragi menunjukkan bahwa *A. paragallinarum* tumbuh, memperbanyak diri, dan bersifat patogen (Blackall, 1995 dan Takagi et al., 1991). Pengamatan perubahan makroskopik pada embrio yang mengalami kematian setelah inokulasi sebagai salah satu karakteristik patogenesitas isolat *A. paragallinarum* belum banyak dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat *A. paragallinarum* melalui inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB) umur 7 hari.

## Materi dan Metode

Isolat *A. paragallinarum* yang akan diuji patogenesitasnya adalah serotipe A strain 221 dan B strain Spross yang didapatkan dari Aburahi Laboratories, Jepang serta serotipe B strain 2448 dan C strain 2447 yang didapatkan dari Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Isolat *Avibacterium paragallinarum* (*A. paragallinarum*) dikultur ke dalam media kaldu *brain heart infusion* (BHI) pada suhu 37°C selama 24 jam secara mikroaerofilik. Pertumbuhan *A. paragallinarum* ditandai dengan perubahan media kaldu BHI yang

menjadi keruh dan terdapat endapan. Kaldu BHI tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambahkan dengan PBS steril sesuai dengan standar McFarland No. 2 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml) (Morales-Erasto et al., 2015; Zhao et al., 2010). Telur ayam berembrio *specific pathogenic free* umur 7 hari berjumlah 40 butir dibagi menjadi 5 kelompok TAB SPF yang diinokulasi *A. paragallinarum*, kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe A strain 221, kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain Spross, kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain 2448, dan kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe C strain 2447 yang masing-masing terdiri dari 10 butir TAB SPF. Telur ayam berembrio *specific pathogenic free* kemudian diinokulasikan 0,2 ml suspensi bakteri dengan konsentrasi  $6 \times 10^8$  cfu/ml (Blackall, 1995 dan Takagi et al., 1991) dengan kedalaman inokulasi  $\frac{3}{4}$  panjang telur ke bagian kuning telur (Takagi et al., 1991). Telur ayam berembrio *specific pathogenic free* yang telah diinokulasi menggunakan suspensi bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati adanya kematian sebanyak 2 kali sehari. Embrio yang mengalami kematian kemudian diamati adanya perubahan makroskopiknya. Kuning telur dari masing-masing telur ayam berembrio *specific pathogenic free* kemudian dilakukan penanaman pada media plat agar coklat (PAC) untuk mengetahui adanya kontaminasi bakteri lain. Sebagai pembandingan hasil perubahan makroskopik dengan kelompok TAB SPF yang diinokulasikan *A. paragallinarum*, sebanyak 10 butir TAB SPF tidak dilakukan inokulasi menggunakan *A. paragallinarum*. Hasil perubahan makroskopik pada telur ayam berembrio dilakukan penilaian yang terbagi menjadi 4 kategori yaitu, skor 0: tidak terdapat perubahan makroskopik pada embrio; skor 1: embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan tubuh. . Pengamatan adanya kekerdilan tidak dapat dilakukan setelah 24 jam *pasca* inokulasi, karena pada hari kedelapan pertumbuhan embrio tidak berbeda secara signifikan dengan hari ketujuh. Hasil penilaian perubahan makroskopik masing-masing kelompok TAB SPF dilakukan penghitungan rata-rata. Analisis statistika menggunakan program

*Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 16.0. Metode yang digunakan adalah *Kruskal Wallis* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata skor perubahan makroskopik dalam setiap antara kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe A strain 221, kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain Spross, kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain 2448, dan kelompok yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe C strain 2447.

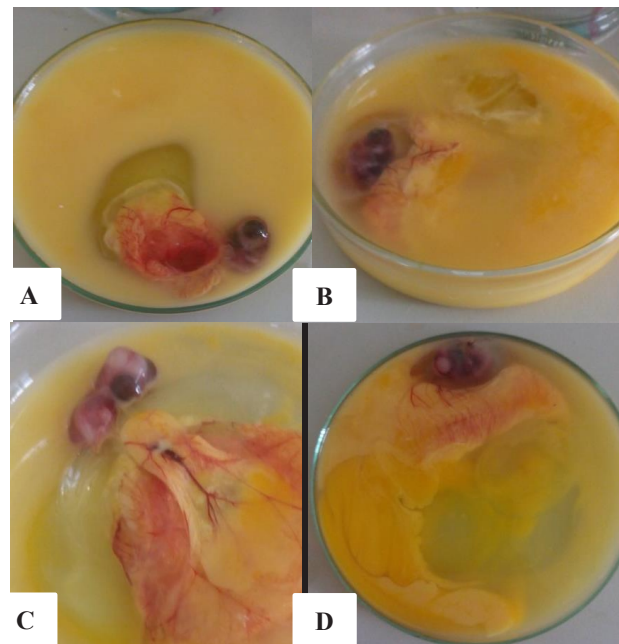
### Hasil dan Pembahasan

Kematian embrio terjadi dalam kurun waktu 24 jam setelah inokulasi kuman, yang ditandai dengan hemoragi. Adanya hemoragi menandakan *A. paragallinarum* tumbuh, memperbanyak diri, dan bersifat patogen (Blackall, 1995 dan Takagi *et al.*, 1991). Gambar 1 disajikan kontrol TAB SPF yang tidak diinokulasi dengan *A. paragallinarum*, sedangkan Gambar 2 disajikan TAB SPF yang diinokulasi dengan isolat *A. paragallinarum* yang digunakan untuk ujiantang. Hasil panen kuning telur kemudian dikultur pada media pelat agar coklat (PAC) untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi bakteri lain. Sedangkan, pada TAB SPF yang tidak diinokulasikan dengan kuman menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri pada PAC. Pada Gambar 3 ditampilkan salah satu hasil kultur kuning telur pada PAC dengan hasil morfologi koloni kecil, bulat, transparan seperti tetes embun, tercat Gram negatif kokobasil yang merupakan karakter morfologi koloni dan sel dari *A. paragallinarum* (Akter *et al.*, 2016 dan Blackall dan Soriano-Vargas, 2013).

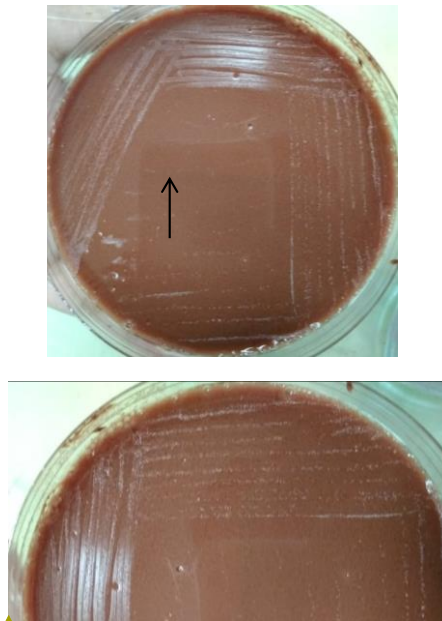
Gambar 4 disajikan jenis perubahan makroskopik pada embrio dari telur ayam berembrio SPF yang tidak diinokulasi dan diinokulasi *Avibacterium paragallinarum* (*A. paragallinarum*) berbagai serotipe. Masing-masing TAB SPF umur 7 hari yang diinokulasikan *A. paragallinarum* serotipe A strain 221, B strain Spross, B strain 2448, dan C strain 2447 menunjukkan perubahan makroskopik berupa embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan tubuh sebanyak 10 butir (100%).



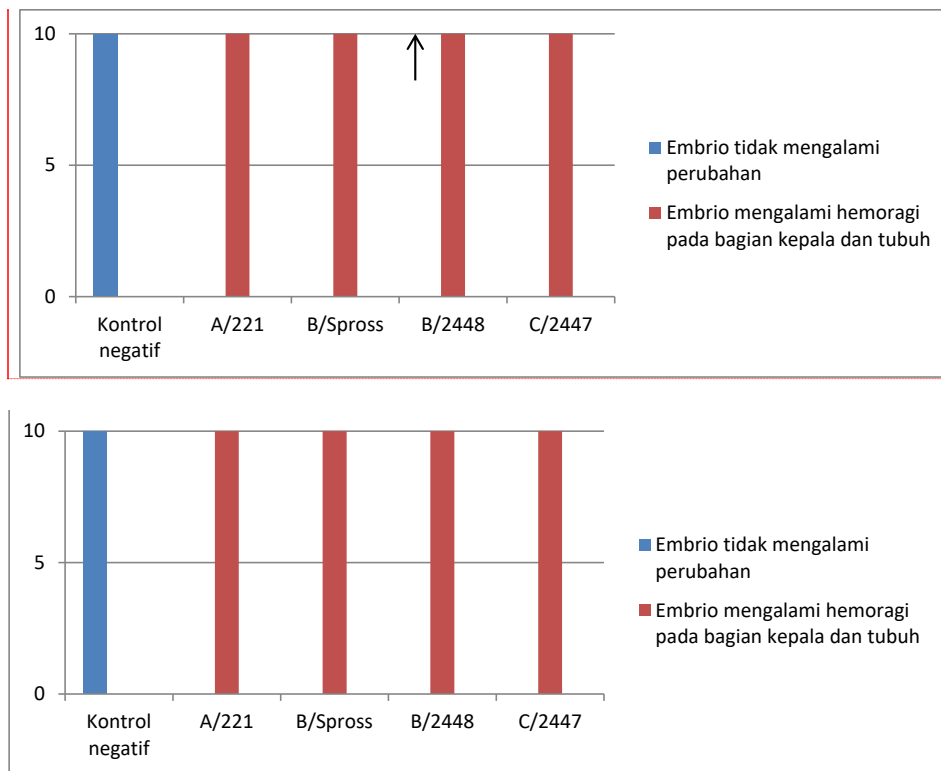
Gambar 1. Kontrol negatif telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF), terlihat bahwa embrio tidak mengalami lesi.



Gambar 2. Perubahan pada embrio yang diinokulasi. (A) Embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan tubuh pada kelompok TAB SPF yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe A strain 221; (B) embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan tubuh pada kelompok telur ayam berembrio yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain Spross; (C) embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan badan pada kelompok telur ayam berembrio yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain 2448; dan (D) embrio mengalami hemoragi pada bagian kepala dan badan pada kelompok telur ayam berembrio yang diinokulasi *A. paragallinarum* serotipe B strain 2448 dan serotipe C strain 2447.



Gambar 3. Hasil kultur kuning telur pada PAC. Hasil kultur kuning telur yang sebelumnya telah diinokulasi isolat *A. paragallinarum* untuk uji tantang. Koloni bakteri bersifat seragam yaitu kecil, bulat dan transparan.



Gambar 4. Jenis perubahan makroskopik pada embrio dari telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) masing-masing sebanyak 10 butir dengan umur 7 hari antara kelompok kontrol negatif (TAB SPF yang tidak diinokulasi *A. paragallinarum*) dengan kelompok yang diinokulasi dengan *A. paragallinarum* berbagai serotipe. Selanjutnya, dilakukan penghitungan rata-rata skor perubahan makroskopik dari masing-masing kelompok TAB SPF yang diinokulasi *A. paragallinarum* berbagai serotipe. Hasil penghitungan rata-rata skor perubahan makroskopik tersebut disajikan pada Tabel 1.



Tabel 1. Penghitungan rata-rata skor perubahan makroskopik dari masing-masing kelompok TAB SPF yang diinokulasi *A. paragallinarum* berbagai serotype

Kelompok Perlakuan	Rata-rata
Kontrol negatif	0,00±0,00 <sup>a</sup>
Inokulasi <i>A. paragallinarum</i> serotype A/221	2,00±0,00 <sup>ab</sup>
Inokulasi <i>A. paragallinarum</i> serotype B/Spross	2,00±0,00 <sup>ab</sup>
Inokulasi <i>A. paragallinarum</i> serotype B/2448	2,00±0,00 <sup>ab</sup>
Inokulasi <i>A. paragallinarum</i> serotype C/2447	2,00±0,00 <sup>ab</sup>

Keterangan <sup>ab</sup> kelompok dengan *superscript* berbeda memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif melalui pengujian *Kruskal Wallis*.

Adanya lesi makroskopik pada embrio ayam yang berasal dari kelompok TAB SPF yang diinokulasi *A. paragallinarum* berbagai serotype disebabkan oleh kapsul polisakarida milik *A. paragallinarum*. Kapsul polisakarida berfungsi dalam kolonisasi, melindungi bakteri dari fagositosis dan menimbulkan lesi. Adanya lesi dapat juga disebabkan karena *cytolethal distending toxin* (CDT) adalah toksin yang diproduksi oleh bakteri patogen Gram negatif. CDT secara normal mengandung tiga protein subunit yaitu CdtA, CdtB, dan CdtC, yang disandi oleh tiga gen yang berdekatan dalam sebuah operon. Subunit CdtB memiliki aktivitas *Dnase I-like*, yang menyebabkan kerusakan DNA, siklus sel berhenti dan apoptosis pada sel target. Subunit CdtA dan CdtC dibutuhkan untuk terjadinya ikatan antara CDT dengan permukaan sel dan mentransfer CdtB ke dalam sel. Glikan hospes dan membran kolesterol berperan dalam terjadinya ikatan antara CDT dengan permukaan sel hospes (Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010).

### Kesimpulan

*Avibacterium paragallinarum* serotype A strain 221, B strain Spross, B strain 2448, dan C strain bersifat patogen pada telur ayam berembrio.

### Daftar Pustaka

- Akter, S., Saha, S., Khan, K.A., Amin, M.M., dan Haque, M.E. (2014). Isolation and identification of *Avibacterium paragallinarum* from Layer Chickens in Gazipur, Bangladesh. *Microbes and Health* 3(1): 9-11.
- Akter, M.R., Khan, M.S.R., Rahman, M.M., Kabir, S.M.L., dan Khan, M.A.S. (2016). Article: Epidemic behavior of the etiological agent of infectious coryza in layer chicken of Bangladesh with isolation, identification, and pathogenicity study. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 2(1): 82:94.
- Ali, M., Hossain, M.S., Akter, S., Khan, M.A.H.N.A., dan Hossain, M.M. (2013). Pathogenesis of infectious coryza in chickens (*Gallus gallus*) by *Avibacterium paragallinarum* isolate of Bangladesh. *The Agriculturists* 11(1): 39-46.
- Blackall. (1995). Vaccine against infectious coryza. *World's Poultry Science Journal* 51: 17-26.
- Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. (2013) Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: *Diseases of Poultry 13<sup>th</sup> Edition*. John Wiley & Sons, Inc. United States. 859-873.
- Chen, Y.C., Tan, D.H., Shien, J.H., Hsieh, M.K., Yen, T.Y., dan Chang, P.C. (2014). Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gen from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology* 43: 43-50.
- Gong, Y., Zhang, P., Wang, H., Zhu, W., Sun, H., He, Y., Shao, Q., dan Blackall, P.J. (2014). Safety and efficacy studies on trivalent inactivated vaccines against infectious coryza. *Veterinary immunology and immunopathology* 158: 3-7.
- Morales-Erasto, V., Maruri-Esteban, E., Trujillo-Ruiz, H.H., Talavera-Rojas, M., Blackall, P.J., dan Soriano-Vargas, E. 2015. Protection conferred by infectious coryza vaccines against emergent *Avibacterium paragallinarum* serovar C-1. *Avian Diseases* 59: 162-164.
- Patil, V.V., Mishra, D.N., dan Mane, D.V. (2016). Isolation, characterization, and serological study of *Avibacterium paragallinarum* field isolates from Indian Poultry. *Journal of Animal and Poultry Sciences* 5(1): 13-20.

- Takagi, M., Takahashi, T., Hirayam, N., Istianingsih, Mariana, S., Zarkasie, K., Sumadi, Ogata, M., dan Ohta, S. (1991). Survey of infectious coryza of chickens in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 53(4): 637-642.
- Wu, J., Chen, P., Shien, J., Shyu, C., Shieh, H.K., Chang, F., dan Chang, P. (2010). Analysis of biosynthesis genes and chemical components of the capsule of *Avibacterium paragallinarum*. *Veterinary Microbiology* 145: 90-99.
- Zhao, Q., Sun, Y., Zhang, X., Kong, Y., Xie, Z., Zhu, Y., Zhou, E., dan Jiang, S. 2010. Evaluation of two experimental infection models for *Avibacterium paragallinarum*. *Veterinary Microbiology* 141: 68-72.