

## Identifikasi *Avibacterium paragallinarum* Menggunakan Metode Multiplex PCR

Rina Dwi Agustiani<sup>1</sup>, Fachriyan H. Pasaribu<sup>2</sup>, Okti Nadia Poetri<sup>2</sup>, Ni Luh Ika Mayasari<sup>2</sup>,  
<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Internasional Women University, Indonesia, <sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit  
Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Bagian Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran  
Hewan, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor, Indonesia  
Email korespondensi : (<sup>1</sup>rinadwiagustiani@iwu.ac.id)

### Abstrak

**Latar Belakang** : Infeksi koryza merupakan infeksi saluran pernafasan bagian atas pada ayam yang disebabkan oleh *Avibacterium paragallinarum*. Bakteri *Av. paragallinarum* memiliki beberapa serotipe diantaranya A, B dan C yang memiliki perbedaan pada sifat antigenesitas dan imunogenesitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan serotipe dari beberapa isolat *Av. paragallinarum* asal ayam petelur yang menunjukkan gejala klinis koryza.

**Metode** : Menggunakan metode Multiplex PCR (mPCR).

**Hasil** : Lima belas sampel usapan sinus asal ayam petelur komersil di daerah Jawa Tengah yang diisolat pada tahun 2013-2014, digunakan di dalam penelitian ini. Hasil mPCR menunjukkan bahwa enam isolat merupakan *Av. paragallinarum* serotipe A, tujuh isolat merupakan serotipe C-4 serta dua isolat gabungan serotipe A dan C-4.

**Kesimpulan** : Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa serotipe *Av. paragallinarum* yang menyebabkan infeksi koryza pada ayam petelur di Jawa Tengah adalah serotipe A dan C-4.

**Kata kunci**: Koryza, *Avibacterium paragallinarum*, Serotipe, mPCR

### Abstract

**Background** : *Infectious coryza* is an upper respiratory tract infects in chickens caused by *Avibacterium paragallinarum*. *Av. paragallinarum* has several serotypes which is A, B and C which that has difference in their antigenicity and immunogenicity properties. (Objective) This study aims to determine serotypes of some *Av. paragallinarum* isolates from laying hens with clinical symptoms of coryza.

**Method** : Using multiplex PCR method (mPCR).

**Results** : Fifteen sinus swab samples from commercial laying hens in Central Java areas isolated in 2013-2014 that were used in this study. mPCR results showed that six isolates are *Av. paragallinarum* were belong to serotype A, seven isolates were belong to serotypes C-4, whilst two other isolates were belong to serotypes A and C-4.

**Conclusion** : Our results indicating that *Av. paragallinarum* serotypes A and C were the cause of infection coryza amongst laying hens in Central Java.

**Key words**: Koryza, *Avibacterium paragallinarum*, Serotype, mPCR

## PENDAHULUAN

Koryza adalah penyakit pernapasan akut ayam yang disebabkan oleh *Av. paragallinarum*, penyakit ini sangat menular dan menyebabkan infeksi pada saluran pernapasan bagian atas ayam yang bersifat akut dan bisa berubah menjadi penyakit pernapasan kronis<sup>1</sup>. Infeksi *Av. paragallinarum* dapat terjadi pada semua ayam yang sedang dalam masa pertumbuhan, baik pada ayam pedaging atau ayam petelur. Gejala klinis yang terlihat yaitu keluarnya eksudat atau lendir dari sinus hidung dan mulut, kepala bagian depan bengkak, nafsu makan menurun

(anorexia) dan diare. Produksi telur menurun antara 10-40% sehingga penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi pada industri perunggasan<sup>2</sup>.

*Avibacterium paragallinarum* diklasifikasikan menjadi tiga serovar A, B dan C<sup>3</sup>. Sedangkan<sup>4</sup> mengklasifikasikan bakteri ini menjadi dua serovar, 1 dan 2. Selanjutnya<sup>5</sup> melaporkan bahwa serotipe A sesuai dengan serovar 1 sedangkan serotipe C sesuai serovar 2<sup>6</sup>. *Av. paragallinarum* serotipe A dan C saat ini dianggap sebagai

gen penyebab utama infeksi koryza. Varian baru *Av. paragallinarum* baik serotipe B dan C muncul di negara-negara di wilayah Amerika Latin dan Afrika Selatan. Kehadiran varian baru tersebut menyebabkan penurunan efektivitas vaksin *Av. paragallinarum* yang umumnya dibuat dari serotipe klasik A, B dan C.

Infeksi koryza pada ayam di Indonesia telah diketahui sejak tahun 1974 dan disebabkan oleh *Av. paragallinarum* serotipe A dan C<sup>7</sup>. Namun informasi mengenai serotipe *Av. paragallinarum* yang bersirkulasi dan menyebabkan infeksi koryza pada ayam di Indonesia sangatlah terbatas, penelitian terakhir yang dilakukan untuk karakterisasi *Av. paragallinarum* dilakukan pada tahun 2000<sup>8</sup>. Pada penelitian ini akan dilakukan penentuan serotipe *Av. paragallinarum* yang menyebabkan koryza pada ayam petelur komersil di Jawa Tengah dan diharapkan hasil studi yang diperoleh dapat melengkapi, menambahkan informasi mengenai apa saja serotipe *Av. paragallinarum* yang ada di Indonesia.

Isolasi dan identifikasi *Av. paragallinarum* umumnya dilakukan pada media agar yang dilanjutkan dengan uji konfirmasi (uji gula-gula). Namun teknik isolasi dengan media agar mempunyai banyak kendala yaitu perlu waktu lama, bahan media mahal, membutuhkan suplemen faktor tumbuh *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD) dan faktor mikroorganisme komensal lain cepat tumbuh sehingga akan menghambat pertumbuhan *Av. paragallinarum*. Koloni yang dicurigai *Av. paragallinarum* selanjutnya dilakukan uji konfirmasi berupa uji-uji: katalase, ornithin dekarboxilase, galaktoside, dilanjutkan dengan uji fermentasi dan terbentuknya asam dari galaktosa, manitol, sorbitol, sukrosa dan trehalosa<sup>9</sup>.

Metode identifikasi *Av. paragallinarum* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dikembangkan oleh [10,11] berhasil mendeteksi keberadaan *Av. paragallinarum* serotipe B dari sampel usapan sinus ayam yang menunjukkan gejala klinis infeksi koryza. Teknik multiplex

PCR (mPCR) dikembangkan untuk menentukan serotipe *Av. paragallinarum*<sup>12</sup>. Tujuan Penelitian ini adalah melakukan identifikasi dan penentuan serotipe *Av. paragallinarum* yang diisolasi dari ayam petelur komersil yang menunjukkan gejala klinis koryza menggunakan teknik single PCR (sPCR) dan Multiplex (mPCR) mengacu pada [11,12].

## **METODE**

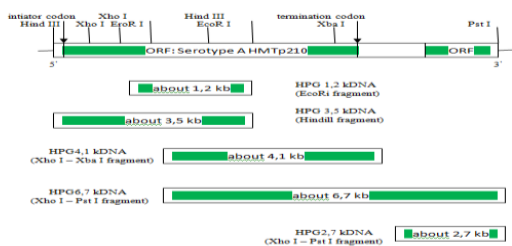
Penelitian ini menggunakan lima belas sampel usapan yang diisolasi dari ayam petelur komersil yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi koryza. Sampel diisolasi pada tahun 2013-2014 di daerah Jawa Tengah. Sampel ini merupakan koleksi dari Laboratorium Imunologi Divisi Mikrobiologi Medik Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet Fakultas Kedokteran Institut Pertanian Bogor. Sebagai kontrol positif digunakan isolat *Av. paragallinarum* serotipe A yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET).

### **Identifikasi *Av. paragallinarum* dengan Metode singel *Polymerase Chain Reaction* (sPCR)**

**Ekstraksi DNA Bakteri.** DNA bakteri *Av. paragallinarum* dilakukan dengan menggunakan kit ekstraksi (*NucleoSpin® Tissue*) Macherey\_Nagel, sesuai dengan prosedur dari manufaktur. Hasil dari ekstraksi berbentuk cair kemudian diukur konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer. **Amplifikasi DNA pada sPCR.** Sekuen DNA dari primer yang digunakan untuk identifikasi *Av. paragallinarum* dilihat pada Tabel 1. Gen target untuk identifikasi *Av. paragallinarum* adalah HPG-2 ditampilkan pada Gambar 1. Kondisi siklus sPCR adalah sebagai berikut : 94°C selama 1 menit diikuti dengan 25 siklus dengan suhu 65°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit, diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 10 menit. Reaksi terdiri dari 25 siklus dari 94°C selama 1 menit, 65°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit, diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 10 menit. Besar produk PCR yang diharapkan adalah 500 bp yang divisualisasikan melalui elektroforesis pada

gel agarosa 1,2% yang mengandung edidium bromida 0,4 µg/ml. Tabel 1. Sekuen DNA Primer untuk identifikasi *Av. paragallinarum*<sup>11</sup>

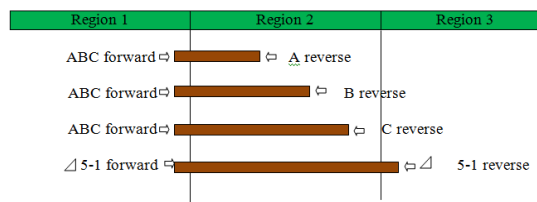
Primer	Sekuen DNA	Gen Target	Besaran Produk
Forward N1	5'-TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT-3'	HPG-2	500 bp
Reverse R1	5'-CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT-3'		



Gambar 1 Gen Target HPG-2

**Penentuan serotyping *Av. paragallinarum* menggunakan mPCR. Amplifikasi DNA pada mPCR.** Sekuen DNA dari primer yang digunakan pada mPCR untuk penentuan serotipe *Av. paragallinarum* adalah HMTp10 yang merupakan gen hipervariabel dari protein haemagglutinin pada membran luar dinding sel bakteri *Av. paragallinarum* (Gambar 2). Kit ekstraksi menggunakan (*NucleoSpin®Tissue*) Macherey\_Nagel, Master Mix Qiagen. Campuran reaksi amplifikasi sebanyak 22 µL mengandung 12,5 µL 2x Multiplex PCR Master Mix Qiagen, 2,5 µL 10x Primer mix, 7 µL Rnas-free water, 3 Tample. Siklus mPCR adalah sebagai berikut 98°C selama 7 menit diikuti 30 siklus dengan suhu 98°C selama 1 menit, 56°C selama 1 menit, 72°C selama 2 menit, diikuti tahap akhir 72°C selama 2 menit<sup>12</sup>. Hasil mPCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 1,2% yang mengandung etidium bromida 0,4 µg/ml. besaran produk mPCR terganggu dari serotipe *Av. paragallinarum* yaitu berikut serotipe A 800 bp, serotipe B 1100 bp dan serotipe C 1600 bp (Tabel 2). Tabel 2 sekuen DNA primer untuk penentuan serotipe *Av. paragallinarum*<sup>12</sup>.

Serotipe	Primer	Besaran produk	Sekuen DNA
A	ABC forward	800 bp	5'-GGCTCACAGTTTATGCAACGAA-3'
	A reverse		5'-CGCGGATTGTGATTTTGT-3'
B	ABC forward	1100 bp	5'-GGCTCACAGTTTATGCAACGAA-3'
	B reverse		5'-GGTGAATTCACCAACACCAC-3'
C	ABC forward	1600 bp	5'-GGCTCACAGTTTATGCAACGAA-3'
	C reverse		5'-TAATTTTCTTATCCAGCATCAATACCAT-3'

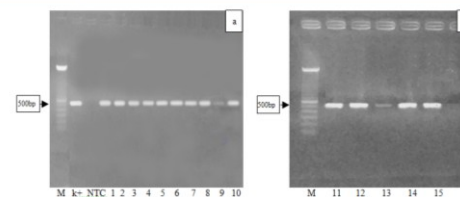


Gambar 2 HMTp210 lokasi untuk primer PCR

Analisis Data . Seluruh data yang didapat dari studi ini dianalisa secara deskriptif.

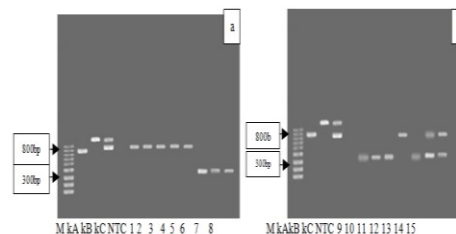
## HASIL

Lima belas sampel usapan sinus yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif *Av. paragallinarum* dengan metode sPCR ditampilkan pada Gambar 3. Targen gen pada sPCR adalah gen HPG-2 yang akan menunjukkan besaran produk PCR pada 500 bp.



Gambar 3. Visualisasi hasil sPCR *Av. paragallinarum* panjang pita 500 bp sekuen amplifikasi HPG-2 PCR. (a) Line 1 M = Marker 100bp, Line 2 : kontrol positif (k+), Line 3 : non template control (NTC) Line 4 - 13 = sampel 1- 10. (b) Line 1 M = Marker 100bp, Line 2 - 6 = sampel 11-15.

Serotyping *Av. paragallinarum* dengan mPCR. Hasil mPCR menunjukkan bahwa enam isolat merupakan *Av. paragallinarum* serotipe A, tujuh isolat merupakan serotipe C-4, serta dua isolat merupakan gabungan serotipe A dan C-4. Visualisasi mPCR ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Visualisasi hasil mPCR *Av. paragallinarum* sekuen amplifikasi HMTp210 PCR. Line 1 M = Marker = 100 bp, 800bp untuk A dan 300bp untuk C-4, (a) Line 2 : kontrol positif (KA), Line 3 : (KB), Line 4 : KC (K A dan B), Line 5 : (NTC) non template control, Serotipe A Line 6, 7, 8, 9, 10 = sampel 1 - 5, Serotipe C-4 Line 11, 12, 13 = sampel 6 - 8. (b) Serotipe C, Line 6, 7, 8, 10 = sampel 9, 10, 11, 13, Serotipe A Line 9 = sampel 12 dan Serotipe A, C-4 Line 11 dan 12 = sampel 14 dan 15.

Hasil identifikasi lima belas sampel usapan sinus ayam petelur komersil dengan sPCR menunjukkan hasil positif keberadaan bakteri *Av. paragallinarum*. Hasil visualisasi produk mPCR menunjukkan hasil sebagai berikut: enam isolat memiliki besar pita 800 bp yang merupakan seroyipe A, tujuh isolat memiliki besaran pita 300 bp yang merupakan serotipe C-4<sup>13</sup>. Ringkasan hasil sPCR dan mPCR dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil sPCR dan mPCR dari sampel usapan sinus

No Isolat	sPCR (500 bp)	mPCR			
		Serotype A (800 bp)	Serotype B (1100 bp)	Serotype C (1600 bp)	Serotype C-4 (300 bp)
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
6	+	-	-	-	+
7	+	-	-	-	+
8	+	-	-	-	+
9	+	-	-	-	+
10	+	-	-	-	+
11	+	-	-	-	+
12	+	+	-	-	-
13	+	-	-	-	+
14	+	+	-	-	+
15	+	+	-	-	+

Keterangan: (+) = Positif (-) = Negative

## PEMBAHASAN

Pada hasil sPCR ini sesuai dengan penelitian<sup>12</sup> bahwa positif *Av. paragallinarum* di besaran pita sebesar 500 bp kemudian dilanjutkan mPCR yang menunjukkan besaran pita yang berbeda pada masing-masing serotipe (A, B dan C). serotipe C memiliki antisera C-1, C-2, C-3, C-4. Serotipe A dan C 50% mempunyai kemiripan di regio. Dengan demikian, serotipe A dan C spesifik pada regio di gen HMTp 210, yang merupakan gen yang conserved untuk menunjukkan serotipe A dan C<sup>14</sup>. Pada besaran pita 300 bp tergolong kedalam serotipe C-4<sup>13</sup> sedangkan serotipe B pada pita besaran 1100 bp tidak terdeteksi, hal ini sesuai dengan<sup>5</sup> dimana serotipe B dinyatakan sebagai serotipe yang tidak patogen dan serotipe B bersifat spesifik lokal, yang artinya serotipe B yang ditemukan di suatu lokasi sangat berbeda serotipe B di tempat yang lain.

Pada penelitian ini tidak dilakukan teknik isolasi dan identifikasi menggunakan media agar maupun uji serologis dalam menentukan serotipe *Av. paragallinarum*.

Teknik isolasi dan identifikasi menggunakan media agar memiliki kendala antara lain memerlukan waktu lama, harga media relatif mahal dan kondisi laboratorium maupun sumber daya harus yang memadai dan faktor mikroorganisme komensial lain cepat tumbuh sehingga akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang akan dicari<sup>15</sup>, selain itu *Av. paragallinarum* memerlukan media spesifik yang mahal dan suplemen faktor tumbuh *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD).

Teknik serologis yang umum digunakan untuk *serotyping Av. paragallinarum* adalah uji hambatan hemaglutinasi (HI) yang terbagi menjadi tiga uji yaitu : *simple*, *extracted* dan *treated*. Uji HI yang paling sederhana didasarkan pada menggunakan sel utuh *Av. paragallinarum* serotipe A dan sel erosit ayam<sup>16</sup>. Teknik ini hanya dapat mendeteksi antibodi pada ayam hasil vaksinasi atau yang pernah terinfeksi atau terpapar oleh *Av. paragallinarum* serotipe A. Metode *extracted* HI didasarkan pada *potassium thocyarate* (KSCN) ekstraksi dari sel *Av. paragallinarum* yang disonikasi dan erosit ayam yang difikasi dengan glutaraldehid<sup>17</sup>. Uji ini dapat membedakan antibodi spesifik serotipe C pada darah ayam yang terinfeksi atau divaksinasi dengan *Av. paragallinarum* serotipe C, kelemahan dari uji *extracted* HI, yaitu ayam yang terinfeksi secara alamiah akan bereaksi negatif. Uji *treated* HI dilakukan berdasarkan pada perlakuan hialuronidase sel utuh *Av. paragallinarum* dan erosit ayam yang difikasi dengan formaldehid<sup>18</sup>. Teknik ini belum distandarisasi dan belum dipakai. Uji ini dipakai untuk deteksi antibodi pada ayam yang divaksinasi dengan vaksin *coryza* serotipe A, B dan C tapi hanya antibodi A dan C yang menunjukkan hasil titer yang tinggi.

Teknik isolasi dan identifikasi menggunakan media agar dan uji HI, tentu saja tidak dapat digantikan begitu dengan teknik sPCR untuk menentukan agen penyebab utama dan mPCR untuk menentukan seroyipe *Av. paragallinarum*. Berdasarkan<sup>19</sup> *gold standar* untuk *seotyping Av. paragallinarum* adalah uji HI sehingga

tidak bisa mengevaluasi hasil identifikasi dengan sPCR serta hasil *serotyping* dengan teknik mPCR. Namun untuk kebutuhan diagnosa cepat penyebab koryza, teknik molekuler seperti sPCR dan mPCR dapat direkomendasikan karena teknik ini mengidentifikasi gen spesifik dari *Av. paragallinarum*.

## KESIMPULAN

Penelitian ini mengindikasikan bahwa serotipe *Av. paragallinarum* yang menyebabkan infeksi koryza pada ayam petelur di Jawa Tengah adalah serotipe A dan C-4.

## DAFTAR PUSTAKA

- Blackall PJ, Soriano EV. Infectious Coryza and Related Bacterial Infection. *Diseases of poultry*. 2008;789–803.
- Droual R, Bickord AA, Chariton BR, Cooper GL, and Channing SE. Infection *coryza* in meat in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis*. 1990;34:1009-1016.
- Page LA. *Haemophilus* infections in chickens Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J of Vet Res*. 1962;23:85–95.
- Sawata A, Kume K, and Nakase Y. *Haemophilus* infection in chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus paragallinarum* isolat recovered from diseased chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No.21. *Jpn J Vet Sci*. 1978;40:645 – 652.
- Kume K, Sawata A, and Nakase Y. Immunologic relationship between page's and sawata serovar antiserums of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J of Vet Res*. 1980;41:757 – 760.
- Sawata A, Kume K and Nakase Y. Biologic and serologic relationships between Page's dan Sawata's serovars of *Haemophilus paragallinarum*. *J Vet Res*. 1980;41:1901 – 1904.
- Poernomo S. *Haemophilus gallinarum* pada ayam isolasi *Haemophilus gallinarum* pada ayam. *Bull LPPH*. 1975;8(9):11 – 13.
- Poernomo S, Sutarma, Rafiiee M and Blackall PJ. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *J Vet Aust*. 2000;78:262 – 295.
- Blackall, PJ. Infectious *coryza*: Overview of the disease and new diagnostic options. *J Clin Microbiol Res*. 1999;12(4):627 – 632.
- Mifflin JK, Horner RF, Blackall PJ, Chen X, Bishop GC, Morrow CJ, Yamaguchi T and Iritani. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD) independent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*. 1995;39:304-308.
- Chen XQ, Chen PZ, Feng W and Blackall PJ. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. *Avian Pathol*. 1998;27:296-300.
- Sakamoto R, Kono Y and Sakauchi M. Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med*. 2012;74:271-273.
- Erasto VM, Jesu PQ, Manolo FD, Luis ES, Simon MC, Blackall PJ and Vargas ES. An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction. *J Vet. Diagn Invest. Brief Research Reports*. 2014.10.1177/1040638714523612.
- Wu JR, Wu YR, Shien JH, Hsu YM, Chen CF, Shieh HK and Chang PC. Recombinant protein containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine*. 2011;29:660-667.
- Blackall PJ, Silvia EN, Yamaguchi Y, and Iritani Y. Characterization of isolates of isolates of avian haemophili from Brazil. *Avian Dis*. 1994;38:269–274.
- Iritani, Y, Sugimori G and Katagiri. Serologic response to *Haemophilus paragallinarum* in artificially infected and

- vaccinated chicken. Avian Dis. 1997;21:1-8.
17. Sawata A, Kume K and Nakase Y. Biologic and serologic relationships between Page's dan Sawata's serovars of *Haemophilus paragallinarum*. J Vet Res. 1982;41:1901 – 1904
  18. Yamaguchi, Iritani TY and Hayashi Y. Hemagglutinating activity and immunological properties of *Heamophilus paragallinarum* field isolates in Japan. Avian Dis. 1989;33:511-515.
  19. OIE. Office Interntional des Epizooties. Avibacterium paragallinarum adopted by the world assembly of delegates of the OIE terrestrial manual. 2016[internet],[diunduh 2017Juni 3] Tersedia dari [http://www.oie.int/wahis2/public/wahid.php/Avibacterium/nmp?terristeria 1 start month=1&date submit=OK](http://www.oie.int/wahis2/public/wahid.php/Avibacterium/nmp?terristeria%201%20start%20month=1&date%20submit=OK).

