

HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM PADA AYAM DI INDONESIA: II. SIFAT-SIFAT FISILOGIK DAN BIOKIMIWI ISOLAT HAEMOPHILUS SPP. DARI AYAM SAKIT

SRI POERNOMO¹, SUTARMA¹, dan YAPTO NAZARUDIN²

¹ Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia
² Kepuhargo, Karang Ploso, Malang, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 6 Februari 1997)

ABSTRACT

SRI POERNOMO, SUTARMA, and Y. NAZARUDIN. 1997. *Haemophilus paragallinarum* in chickens in Indonesia: II. Physiological and biochemical properties of *Haemophilus* spp. from diseased chickens. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (4): 263-266.

A total of 46 isolates of *Haemophilus* spp. consisted of 42 local isolates from diseased chickens and four reference strains of *Haemophilus paragallinarum* were examined for their physiological and biochemical properties. These isolates consisted of 2 groups. One group consisted of 21 local isolates and reference strains of *H. paragallinarum* were catalase negative and identified as *Haemophilus paragallinarum* and they did not ferment galactose and trehalose. The other group was catalase positive and suspected as *Haemophilus avium*. This catalase positive group of these 21 avian *Haemophili* should be examined with other carbohydrates in order to be identified accurately.

Keywords : *Haemophilus* spp., physiological, biochemical, chickens

ABSTRAK

SRI POERNOMO, SUTARMA, dan Y. NAZARUDIN. 1997. *Haemophilus paragallinarum* pada ayam di Indonesia: II. Sifat-sifat fisiologik dan biokimiawi isolat *Haemophilus* spp. asal ayam sakit. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (4): 263-266.

Sejumlah 46 isolat *Haemophilus* spp. yang terdiri dari 42 isolat asal ayam sakit dan 4 isolat *H. paragallinarum* galur referensi, diperiksa sifat-sifat biokimiawi dan fisiologiknya. Dari 46 isolat tersebut dibedakan dalam 2 kelompok. Satu kelompok terdiri dari 25 isolat termasuk 4 isolat *H. paragallinarum* galur referensi adalah katalase negatif dan tidak mengadakan fermentasi terhadap galaktosa dan trehalosa. Grup pertama ini diidentifikasi sebagai *H. paragallinarum* yang terdiri dari 21 isolat lokal dan 4 isolat referensi, sedangkan grup yang lain terdiri dari 21 isolat adalah katalase positif, dicurigai sebagai *Haemophilus avium*, karena sifat-sifat biokimiawinya yang sangat indifferen (bervariasi), maka perlu diteliti lebih lanjut supaya dapat ditetapkan secara pasti klasifikasinya.

Kata kunci: *Haemophilus* spp., fisiologik, biokimiawi, ayam

PENDAHULUAN

Bakteri *Haemophilus* asal unggas pertama kali ditemukan pada tahun 1931 oleh de Blicck yang diberi nama *Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum* sebagai penyebab snot atau coryza. Kemudian pada Tahun 1934, Eliot dan Lewis, Delaplane *et al.*, yang masing-masing bekerja secara terpisah memberi nama bakteri penyebab snot pada ayam ini *Haemophilus gallinarum* (YAMAMOTO dalam HOFSTAD *et al.*, 1984). SCHALM dan BEACH (1936) melaporkan bahwa isolat *H. gallinarum* yang mereka temukan memerlukan haemin (faktor x) dan faktor v (*nicotinamide adenine dinucleotide*/NAD) untuk pertumbuhannya. Kemudian PAGE (1962) melaporkan bahwa *Haemophilus* penyebab snot (coryza) hanya memerlukan faktor v, tetapi tidak faktor x untuk pertumbuhan *in vitro*. Selanjutnya dikenal spesies baru dengan nama *H. paragallinarum* untuk *Haemophilus* yang hanya memerlukan faktor v untuk pertumbuhan *in vitro*, sebagai penyebab snot pada ayam (Biberstein dan White, 1969 dalam BLACKALL dan YAMAMOTO, 1989), sedangkan *Haemophilus* dari unggas

yang hanya memerlukan faktor v untuk pertumbuhan *in vitro* dan tidak menyebabkan snot pada ayam dinamakan *H. avium* (REID dan BLACKALL, 1984).

Bagian I dari tulisan ini yang memuat isolasi bakteri penyebab snot pada ayam yang pertama kali di Indonesia, masih diberi nama *H. gallinarum* (SRI POERNOMO, 1975). Penelitian ini dimaksudkan untuk mempelajari sifat-sifat biokimiawi isolat *Haemophilus* spp. dari ayam baik ayam ras maupun buras.

MATERI DAN METODE

Bakteri

Sebanyak 46 isolat yang terdiri dari 4 isolat standar *H. paragallinarum* yang diterima dari Dr. Pat Blackall (Department of Primary Industries, Animal Research Institute, Yeerongpilly, Australia), terdiri dari 3 serotipe Page A, B, C dan serotipe 221 dari Jepang; 21 isolat yang diasingkan dari ayam sakit snot pada tahun 1987-1989, yang berasal dari Kabupaten Bogor, Sukabumi dan Suku Dinas Jakarta Selatan, sedang 21 isolat lainnya berasal

dari ayam sakit snot yang diasingkan pada tahun 1991-1994 dari Kabupaten Bogor, Ciamis (Jawa Barat), Karang Anyar (Jawa Tengah) dan Lampung (Sumatera). Isolat yang dari Ciamis diasingkan dari ayam buras. Sebagian isolat berupa isolat segar dari kasus snot, sebagian berupa biakan *Haemophilus* spp. dalam bentuk kering beku.

Medium

Medium yang dipergunakan untuk membiakkan dan memelihara bakteri untuk persiapan uji biokimiawi mengandung pepton 1%, NaCl 1%, pati 0,1%, dekstrosa/glukosa 0,1%, aquades 1000 ml, ditambah dengan oleik-albumin kompleks 5% (volume/volume), serum ayam steril 1% (v/v), NAD 0,01% (bobot/volume), untuk medium padat ditambah agar 1,5%. Medium ini disebut TM/SN (BLACKALL, 1990, komunikasi pribadi). Medium untuk isolasi bakteri *Haemophilus* dari eksudat ayam yang menderita snot memakai agar darah dengan *Staphylococcus hycus* sebagai *feeder culture*. Biakan pada medium cair (TM/SN tanpa agar), dieramkan secara aerobik, sedangkan medium padatnya (agar) dieramkan dengan kondisi CO₂ yang dinaikkan \pm 5% (BLACKALL, 1983; 1988).

Metode

Semua isolat *Haemophilus* spp. ini dibuat preparat dan diwarnai dengan pewarnaan Gram.

Fermentasi karbohidrat: Medium TM/SN padat (agar), tanpa glukosa/dekstrosa dan pati dipakai sebagai medium basal, untuk uji karbohidrat. Medium basal ini kemudian ditambah *phenol red* 0,004% (b/v=bobot/volume), dan karbohidrat yang bersangkutan 2% (b/p), pH diatur 7,00. Kemudian medium dituangkan ke dalam cawan Petri \pm 20 ml dengan diameter 90 mm. Bakteri *Haemophilus* sp. yang akan diuji dibiakkan pada medium yang telah mengandung karbohidrat tersebut dengan dawai atau pipet Pasteur, kemudian dieramkan pada suhu 37°C dalam lemari pengeram CO₂ (\pm 5%) selama 48 jam. Di samping itu, bakteri juga ditanam pada medium kontrol yang tidak mengandung karbohidrat dan dieramkan bersama-sama dalam lemari pengeram CO₂. Setelah dieramkan 48 jam, biakan bakteri *Haemophilus* dipindahkan dari lemari pengeram CO₂ ke lemari pengeram biasa dengan suhu 37°C selama 2 jam dan kemudian dibaca hasilnya. Pembentukan asam ditunjukkan oleh adanya zona (daerah) warna kuning di sekeliling dan di bawah pertumbuhan bakteri *Haemophilus* sp. (BLACKALL, 1990, komunikasi pribadi). Karbohidrat yang diuji adalah galaktosa, glukosa, laktosa, maltosa, manitol, sorbitol, sukrosa, trehalosa dan xilosa.

Uji lain: Di samping itu juga dilakukan uji indol menurut metode COWAN (1974) dengan menambahkan serum ayam 1% (v/v), NAD 0,01% (b/v) pada basal mediumnya (BLACKALL, 1988). Uji katalase dilakukan

menurut BLACKALL dan REID (1982). Kebutuhan akan faktor x dilakukan dengan memakai agar darah yang diotoklafkan (SCHALM dan BEACH, 1936), sedangkan faktor v (NAD) dilakukan menurut BLACKALL dan REID (1982). Pemeriksaan pigmen kuning dilakukan pada medium TM/SN agar yang dieramkan selama 2-5 hari (BLACKALL dan REID, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan pewarnaan gram semua isolat *Haemophilus* dari lapangan berbentuk batang pendek dan Gram negatif. Dari 42 *Haemophilus* spp. isolat lapangan (lokal), 21 isolat yang diasingkan pada tahun 1991-1994 adalah katalase negatif, seperti isolat *H. paragallinarum* standar serotipe Page A, B, C dan 221 dari Jepang, sedangkan 21 isolat yang diasingkan dari ayam yang menderita snot pada tahun 1987-1989 adalah katalase positif (Tabel 1). *Haemophilus* spp. yang katalase negatif semuanya tidak membentuk asam terhadap galaktosa, laktosa, trehalosa dan xilosa, membentuk asam terhadap glukosa, maltosa, sukrosa dan variabel terhadap manitol (14/21) dan sorbitol (16/21) seperti terlihat pada Tabel 1. Reaksi dari 21 isolat *Haemophilus* katalase-negatif terhadap karbohidrat tersebut di atas sama dengan sifat-sifat *H. paragallinarum* serotipe A, B, C dan 221 sebagai standar, kecuali Modesto (serotipe C) yang bereaksi negatif terhadap maltosa dan serotipe B (222) bereaksi negatif terhadap sukrosa. Sementara itu, 21 isolat *Haemophilus* yang katalase positif, semua bereaksi negatif terhadap xilosa, bereaksi positif terhadap glukosa dan sukrosa dan variabel terhadap galaktosa (18/21), laktosa (1/21), maltosa (20/21), manitol (20/21); trehalosa (7/21) seperti terlihat pada Tabel 1.

Semua *Haemophilus* isolat lokal (42) membutuhkan faktor v dan tidak faktor x untuk pertumbuhannya secara *in vitro*, tidak mengadakan haemolisis pada agar darah, tidak membentuk indol. Pada agar darah yang diotoklafkan semua isolat *Haemophilus* tidak tumbuh. Ini berarti semua isolat bakteri tidak memerlukan haemin atau faktor x (SCHALM dan BEACH, 1936).

Dari 42 *Haemophilus* isolat lokal asal ayam sakit tersebut terdiri atas 2 kelompok, yaitu 21 isolat katalase-negatif dan 21 sisanya katalase-positif. Berdasarkan sifat-sifat yang dimiliki oleh 21 isolat *Haemophilus* katalase-negatif terhadap kebutuhan akan faktor v dan x, CO₂, pembentukan indol dan fermentasi karbohidrat (Tabel 1), maka bakteri ini termasuk *Haemophilus paragallinarum* (Hpg) penyebab snot pada ayam (PAGE, 1962; BLACKALL dan REID, 1982; BLACKALL, 1983; YAMAMOTO dalam HOFSTAD *et al.*, 1984; BLACKALL *et al.*, 1989). Menurut YAMAMOTO (dalam HOFSTAD *et al.*, 1984), Hpg yang diasingkan dari berbagai tempat di seluruh dunia tidak ada yang mengadakan fermentasi galaktosa dan trehalosa sedang karbohidrat yang lain bervariasi dan ternyata untuk 21 isolat *Haemophilus* katalase-negatif asal lapangan

Tabel 1. Sifat-sifat biokimiawi dan fisiologik *Haemophilus* spp. asal ayam sakit dan *Haemophilus paragallinarum* galur referensi (standar)

Sifat-sifat	<i>H. paragallinarum</i> serotipe standar				Isolat lokal <i>Haemophilus</i> spp.	
	A	B	C	C	1991-1994	1987-1989
	(083)	(222)	(Modesto)	(221)	(21 isolat)	(21 isolat)
Katalase	-	-	-	-	-(21) ^a	+(21) ^a
Hemolisis	-	-	-	-	-(21)	-(21)
Pigmen kuning	-	-	-	-	-(21)	+(8)
Pertumbuhan pada agar darah yang diotoklafkan	-	-	-	-	-(21)	-(21)
Kebutuhan akan:						
CO ₂	+	+	+	+	+(21)	+(21)
faktor v	+	+	+	+	+(21)	+(21)
faktor x	-	-	-	-	-(21)	-(21)
Pembentukan indol	-	-	-	-	-(21)	-(21)
Fermentasi dari:						
galaktosa	-	-	-	-	-(21)	-(18)
glukosa	+	+	+	+	+(21)	+(21)
laktosa	-	-	-	-	-(21)	-(20)
maltosa	+		+	+	+(21)	+(20)
manitol	+		+	+	+(21)	+(20)
sorbitol	+		+	+	+(21)	+(10)
sukrosa	+		+	+	+(21)	+(21)
trehalosa	-		-	-	-(21)	-(14)
xilosa	-		-	-	-(21)	-(21)
Pola fermentasi (biovar)	I	IV	V	I	I (14)	III (7)

Keterangan: - = hasil negatif + = hasil positif
a = angka dalam kurung menunjukkan jumlah hasil uji di depannya (+/-)

Biovar	I	: manitol +;	maltosa +;	sukrosa +	(BLACKALL <i>et al</i> , 1989)
	II	: manitol +;	maltosa -;	sukrosa -	
	III	: manitol -;	maltosa +;	sukrosa +	
	IV	: manitol +;	maltosa +;	sukrosa -	
	V	: manitol +;	maltosa -;	sukrosa +	

tersebut di atas juga menunjukkan reaksi negatif terhadap trehalosa dan galaktosa (Tabel 1).

Dari hasil penelitian BLACKALL *et al.* (1989) terhadap fermentasi karbohidrat dari 92 isolat Hpg, ditemukan 5 pola fermentasi, yaitu: pola fermentasi biokimiawi I isolat Hpg yang mengadakan fermentasi manitol, maltosa dan sukrosa; pola II, manitol positif, maltosa negatif dan sukrosa negatif; pola III, manitol negatif, maltosa positif dan sukrosa positif; pola IV manitol positif, maltosa positif dan sukrosa negatif, sedangkan pola V manitol positif, maltosa negatif dan sukrosa positif. Dari 92 isolat Hpg yang diteliti oleh BLACKALL *et al.* (1989) tersebut ternyata, 75 isolat (81%) termasuk pola fermentasi I, sedangkan isolat Australia termasuk pola fermentasi II dan III, dan satu atau dua isolat termasuk pola fermentasi (biovar) IV dan V. Dari 21 isolat *Haemophilus* katalase-negatif (Tabel 1) tersebut ternyata 14 isolat (66,66%), termasuk biovar (pola fermentasi) I dan 7 isolat termasuk biovar III. *H.*

paragallinarum 083= biovar I; 222= biovar IV; Modesto= biovar V; 221= biovar I (Tabel 1).

Sementara itu, kelompok 21 isolat *Haemophilus* yang katalase-positif ini kemungkinan adalah *H. avium* (BLACKALL dan REID, 1982; BLACKALL, 1988). Mengingat *H. avium* mempunyai sifat-sifat biokimiawi yang heterogen (BLACKALL, 1988), maka perlu diteliti lebih lanjut sifat-sifat fisiologik termasuk biokimiawinya (dengan karbohidrat yang lain) dari 21 isolat yang katalase-positif tersebut sehingga dapat dikonfirmasi secara pasti kedudukannya dalam klasifikasi *Haemophilus* dari ayam. Menurut peneliti terdahulu di luar negeri *Haemophilus* spp. yang katalase-positif adalah tidak patogenik, sedangkan 21 isolat *Haemophilus* spp. yang katalase positif dalam penelitian ini diasingkan dari ayam sakit. Karena itu, perlu dilakukan uji patogenisitas. Menurut BLACKALL (1983) uji biokimiawi dengan metode medium padat lebih akurat bila dibandingkan dengan menggunakan medium cair yang biasa dilakukan

sebelumnya dan apalagi kalau bakteri yang diuji jumlahnya besar, karena dapat memakai aplikator.

KESIMPULAN

Berdasarkan sifat-sifat fisiologik dan biokimiawi 21 isolat *Haemophilus* yang katalase negatif adalah *Haemophilus paragallinarum* sebagai penyebab penyakit snot/coryza pada ayam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Iskandar dan Bapak M.R. Djoepri atas bantuan mereka sehingga tulisan ini dapat disajikan.

DAFTAR PUSTAKA

- BLACKALL, P. J. and G. G. REID. 1982. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*. *Vet. Microbiol.* 7: 359-366.
- BLACKALL, P.J. 1983. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus* species. *J. Microbiol. Methods* 1:275-281.
- BLACKALL, P.J. 1988. Biochemical properties of catalase-positive avian *Haemophili*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2801-2805.
- BLACKALL, P.J. and R. YAMAMOTO. 1989. *Haemophilus gallinarum* a re-examination. *J. Gen. Microbiol.* 135: 469-474.
- BLACKALL, P.J., L.E. EAVES, and D.G. ROGERS. 1989. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using haemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns and antimicrobial drug resistance patterns. *Avian Dis.* 33:491-496.
- BLACKALL, P.J. 1990. Queensland Department of Primary Industries, Animal Research Institute, Yeerongpilly 4105, Australia (Komunikasi pribadi).
- COWAN, S.J. 1974. *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- HOFSTAD, M.S., H.J. BARNES, B.W. CALNEK, W.M. REID, and H.W. YODER JR. 1984. *Diseases of Poultry*. 8th Ed. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA.
- PAGE, L.A. 1962. *Haemophilus* infection in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 85-95.
- REID, G.G. and P.J. BLACKALL. 1984. Pathogenicity of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium* in chickens. *Vet. Biol.* 9:77-82.
- SCHALM, O.W. and J.R. BEACH. 1936. Cultural requirements of the fowl coryza bacillus. *J. Bact.* 31:161-169.
- SRI POERNOMO. 1975. *Haemophilus gallinarum* pada ayam. I. Isolasi *Haemophilus gallinarum* dari ayam. *Bull. LPPH* 6 (8-9):11-22.
- YAMAMOTO, R., 1984. Infection Coryza. *Dalam Diseases of Poultry*, 8th Ed. Hofstad, M.S., *et al.* (Eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 178-186.