

Karakterisasi Molekuler Gen Penyandi *SodC* *Pasteurella multocida* yang Diisolasi dari Kerbau Asal Nusa Tenggara Timur

(MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *SodC* ENCODING GENES
PASTEURELLA MULTOCIDA ISOLATED FROM BUFFALO
OF EAST NUSA TENGGARA ORIGIN)

Ayang Mahindra^{1*}, Hani Plumeriastuti², Didik Handijatno³

¹Program Magister, Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,

²Departemen Patologi Veteriner, ³Departemen Mikrobiologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Kampus-C Unair, Jl Mulyorejo, Kota Surabaya,

Jawa Timur, Indonesia 60115

Telepon +62 31 5992785, 5993016; Fax. +62 31 5993015

*email: ayang.mahindraIPKMV@gmail.com

ABSTRAK

Pasteurella multocida tipe B:2 merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit Septicemia Epizooticae pada ruminansia, khususnya kerbau dan sapi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan gen *SodC* dari *Pasteurella multocida* tipe B:2 yang berperan dalam virulensi bakteri sebagai antifagositosis. Isolat *Pasteurella multocida* tipe B:2 ini diperoleh dari BBVet Denpasar, Bali yang berasal dari Nusa Tenggara Timur (NTT) Indonesia. Sampel ditanam pada *Blood Agar* (BA). Koloni yang terpisah dilihat secara makroskopik (bening, bulat dan berbau manis), mikroskopik (bipolar dan negatif Gram), uji biokimia serta diperiksa menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil positif pada uji PCR apabila menunjukkan pita pada posisi 235 *basepair* (bp). Penelitian ini dilanjutkan dengan uji sekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida dari gen penyandi *SodC Pasteurella multocida* dan juga homologi isolate referensi dari Genbank atau NCBI. Hasil *blast* pada NCBI menyatakan bahwa gen penyandi *SodC* dari isolat penelitian memiliki nukleotida yang sama dengan strain 4407 (97%), Strain Chinese 9N (98%), strain BS168 (97%), strain EB168 China (97%), strain subsp. *multocida* CIRMBP-0884 Prancis (97%), dan strain subsp. *multocida* RCAD0259 Cina (96%).

Kata-kata kunci: *Pasteurella multocida*; uji biokimia; PCR; sekuensing; *SodC*.

ABSTRACT

Pasteurella multocida type B:2 is a bacteria which causing the disease was called Septicemia Epizooticae in ruminants, especially cattle and buffalo. The aims of this research to determine the encoding gene *SodC* of *Pasteurella multocida* type B:2. This isolate of *Pasteurella multocida* type B:2 was obtained from the BBVet Denpasar, Bali that originally from East Nusa Tenggara (NTT) Indonesia. The sample was grown on Blood agar (BA). Separated colonies were grossly observed identified by macroscopicly (transparent, round and sweet-smelling) and microscopicly identified (bipolar and Gram negative), Biochemical test included Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Urease, Simmnons Citrate Agar (SCA), Sulphid Indol Motility (SIM), Sugars Test (Sucrose, Manitol, Maltose, Glucose and Lactose). This Isolate had been test using Polymerase Chain Reaction (PCR), the result of PCR test if *Pasteurella multocida* had band in 235bp. This research was continued with Sequencing test to reveal the nucleotides sequence of the encoding *SodC* gene in *Pasteurella multocida* and also the homology from Genbank or NCBI. Result of Blasting in NCBI revealed that this encoding gene had similar nucleotides sequence with *Pasteurella multocida* strain 4407 (97%), Chinese 9N *Pasteurella multocida* strain (98%), Chinese *Pasteurella multocida* strain BS168 (97%), *Pasteurella multocida* strain EB168 China (97%), *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strain CIRMBP-0884 France (97%), and *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strain RCAD0259 China (96%).

Key words: *Pasteurella multocida*; biochemical test; PCR; sequencing; *SodC*

PENDAHULUAN

Septicaemia Epizooticae (SE), atau *Haemorrhagic Septicaemia* (HS), di Indonesia dikenal sebagai Penyakit Ngorok yang menyerang ruminansia, terutama pada ternak sapi dan kerbau, yang bersifat akut dan fatal (OIE, 2009 ; Jaglic *et al.*, 2006). Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Pasteurella multocida* tipe B:2 dan dilaporkan pertama kali di Indonesia pada tahun 1884 di daerah Balaraja, Tangerang. Pada tahun 1980an, wabah SE juga dilaporkan terjadi di beberapa daerah lain di Indonesia seperti Bengkulu, Sumatera Utara, Riau, Jambi dan Nusa Tenggara Timur. Tingkat kematian sapi dan kerbau di Asia akibat penyakit SE mencapai 100.000 ekor per tahun. Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) merupakan wilayah endemik SE dan hampir setiap tahun kasus SE terjadi secara klinis di seluruh wilayah NTT. *Septicaemia Epizooticae* di Provinsi NTT merupakan satu dari sembilan penyakit hewan menular yang menjadi fokus utama dalam penanggulangan dan pemberantasan yang dilakukan oleh Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar. Penyakit ini secara ekonomis sangat merugikan, infeksi pada sapi dan kerbau di Indonesia pada tahun 1987 dilaporkan mengakibatkan kerugian mencapai Rp 16.2 milyar (Priadi dan Natalia, 2000).

Ashari dan Juarini (2007) menyatakan bahwa hewan yang sembuh dari penyakit SE dapat bertindak sebagai pembawa agen penyakit SE. Putra (2006) menambahkan bahwa hewan pembawa dapat menjadi sumber penularan pada hewan peka lainnya yang sedang mengalami penurunan kondisi tubuh. Infeksi bakteri *P. multocida* tipe B:2 bersifat akut, angka kematiannya tinggi, terutama pada penderita yang telah menunjukkan tanda-tanda klinis yang jelas pada kerbau dan sapi, seperti depresi berat, pyrexia, kebengkakan pada daerah submandibula, dispnoea dan mati.

Patogenesis infeksi *P. multocida* tipe B:2 merupakan hasil interaksi kompleks antara faktor virulensi bakteri spesifik (VFs) dengan inang. Faktor virulensi bakteri spesifik VFs *P. multocida* memberikan pemahaman yang lebih baik terhadap epidemiologi, patogenesis, kekebalan dan pengembangan vaksin terhadap infeksi *P. multocida* (Hatfaludi *et al.*, 2010). Gen VF telah diidentifikasi termasuk lipopolisakarida (LPS) dan protein kapsul (Harper *et al.*, 2006). Gen virulensi lain yang termasuk dalam penyandi struktur virulensi

yang meliputi *iron acquisition* (*hgbA*, *hghB*, *exbBD-tonB* dan *tbpA*); *adhesi*; kolonisasi (*hsf-1*, *hsf-2*, *tadD*, *pfhA*, *ptfA* dan *fimA*); protein membran luar (*oma87*, *psl*, *ompA*, *omph* dan *plpB*); enzim ekstra seluler, seperti superoksida dismutase (*sodA*, *SodC* dan *tbpA*); neuraminidase (*nanB* dan *nanH*); dan toksin (*toxA*) (Hatfaludi *et al.*, 2010).

Perkembangan teknologi terbaru, seperti *indirect hemagglutination* (IHA), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), PCR dan sekuensing, dapat digunakan untuk mendiagnosis dan mengamati dengan cepat dan akurat gen virulensi *P. multocida* tipe B:2 yang menyebabkan penyakit Septikemia Epizooticae pada sapi dan kerbau. Teknik PCR menjadi salah satu uji yang digunakan untuk mendiagnosa penyakit Septikemia Epizooticae. Teknik PCR menggunakan satu pasang primer DNA (Priadi dan Natalia, 2000) dan digunakan juga dalam sekuensing, tetapi masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* atau *reverse*). Sekuensing keseluruhan gen dapat digunakan untuk membedakan garis keturunan dari mikroorganisme. Metode sekuensing telah mengalami perkembangan yang cukup pesat sehingga memungkinkan melakukan analisis terhadap jutaan sekuens DNA per tahun. Keberhasilan analisis sekuensing sangat tergantung pada faktor ketepatan petunjuk cara kerja dan teknologi yang digunakan. Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dari berbagai spesimen pada media *Blood agar* (Clarridge, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mencari keberadaan, melakukan sekuensing serta memeriksa homologi gen penyandi *SodC* isolat lokal *P. multocida* tipe B:2 asal kerbau di Nusa Tenggara Timur. Adapun *SodC* merupakan salah satu faktor virulensi dari bakteri ini, gen tersebut berperan dalam proses kegagalan fagosit bakteri yang dilakukan oleh makrofag (antifagositosis).

METODE PENELITIAN

Spesimen

Spesimen berupa isolat *P. multocida* tipe B:2 asal kerbau yang dikoleksi oleh Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar, Bali. Isolat bakteri ini diisolasi dari hewan kerbau di Nusa Tenggara Timur. Sebagai kontrol positif uji PCR digunakan Vaksin SE produksi Pusvetma yang

mengandung *P. multocida* strain Katha (Siska, 2018).

Penanaman dan Identifikasi Ulang Isolat *P. multocida*

Bakteri *P. multocida* dibiakkan pada media *blood agar* (PT. Agarindo Biological Company) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni akan tampak berlendir, melingkar, cembung, tembus, dan seperti butiran pada pemeriksaan makroskopik. Pemeriksaan mikroskopik mendapatkan *P. multocida* menunjukkan negatif Gram, berbentuk *coccobacillus* (batang pendek) bipolar dan berkapsul (Maulana, 2018).

Identifikasi lebih mendalam dilakukan melalui uji biokimia yang terdiri dari *triple sugar iron agar* (TSIA), *sulfide indole motility* (SIM), uji urease, *simon citrate agar* (SCA) dan uji fermentasi karbohidrat. Bakteri *P. multocida* menunjukkan memfermentasi karbohidrat pada bidang *slat* dan *butt* (asam) media TSIA dan tidak membentuk gas dan hidrogen sulfida H₂S. menunjukkan bakteri menghasilkan indol dengan membentuk cincin berwarna merah di permukaan media dan tidak memperlihatkan gerakan. Bakteri *P. multocida* tidak memfermentasi sitrat. Bakteri *P. multocida* menunjukkan memfermentasi glukosa, sukrosa, dan manitol (Maulana, 2018).

Isolasi DNA dan Identifikasi Gen Virulensi *P. multocida*

Penelitian ini menggunakan QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen) sesuai protokol penggunaannya untuk mengisolasi DNA. Virulensi *P. multocida* dilihat dengan pengamatan gen virulensi *SodC* menggunakan primer *SodC*-Forward: 5'AGTTA GTAGCGGGGTTGGCA3' dan *SodC*-Reverse: 3'TGGTGCTGGGTGATCATCA_TG5' dengan sasaran gen 235 bp (Ewers *et al.*, 2006). Amplifikasi PCR Mixture (berisi 25 iL) diisi dengan 3.2 iL masing-masing primer, 200 iL masing-masing deoxynucleoside triphosphate pada, 1 × PCR buffer, 2 mM MgCl₂, dan 0.5 U of Taq DNA polymerase. Dua puluh Template genome DNA *P. multocida* ditambahkan pada pencampuran ini. Amplifikasi PCR menunjukkan 30 siklus. Siklus meliputi proses denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 57°C selama 30 detik, dan *extension* pada 72°C selama 30 detik. Akhir dari siklus diikuti dengan *extension* pada 72°C selama lima menit. Produk amplifikasi diamati dengan teknik elektroforesis dengan 2% gel agarosa dan dilarutkan dengan

12 µL ethidium bromida. Produk PCR dipilih untuk dimurnikan dan dilanjutkan dengan *sequencing*.

Pengurutan Nukleotida

Pemeriksaan sekuensing pada gen penyandi *SodC* ini dilakukan di Laboratorium *Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga. Sekuensing dilakukan menggunakan protokol Applied Biosystems DNAS Sequencing by Capillary elektroforesis yang telah sedikit diubah. Sebanyak 11 µL HiDi™ Formamida ditambahkan pada tabung 1,5 mL yang berisi spesimen. Suspensi di homogenkan menggunakan *vortex* selama tiga menit, dan selanjutnya disentrifugasi. Sampel pada tabung dimasukkan ke sumur pelat optik dan diinkubasi pada suhu 95°C selama tiga menit. Perlakuan inkubasi dilanjutkan pada suhu 4°C selama tiga menit. Pelat dimasukkan ke dalam mesin AB 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) dan dianalisis menggunakan Program *Sequencing Analysis v.5.2* (Applied Biosystems).

Analisis Data

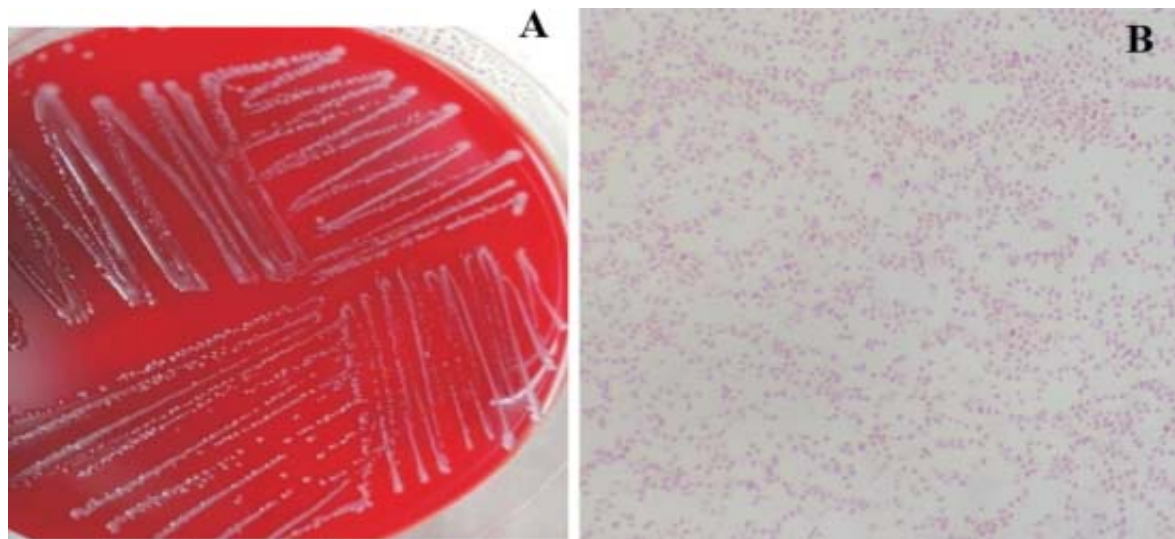
Analisis terhadap hasil pemeriksaan sekuensing dilakukan menggunakan Program BioEdit v.7.9.0 (Hall). Hasil pengolahan data sekuensing dilanjutkan dengan memeriksa homologi gen penyandi *SodC P. multocida* dengan menggunakan Software Blast pada NCBI (Tamura *et al.*, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur dan Identifikasi Ulang Isolat

Hasil yang diperoleh pada pemeriksaan makroskopik dari bakteri *P. multocida* pada media *blood agar* menunjukkan koloni berbentuk bulat, bening, transparan, berbau manis tanpa adanya hemolisis (Gambar 1A). Hasil yang diperoleh pada pemeriksaan mikroskopik adalah bakteri berbentuk *coccobacillus* (batang pendek), negatif Gram, bipolar dan berantai pendek (Gambar 1B). Hasil yang sama diperoleh Kuhnert *et al.*, (2000).

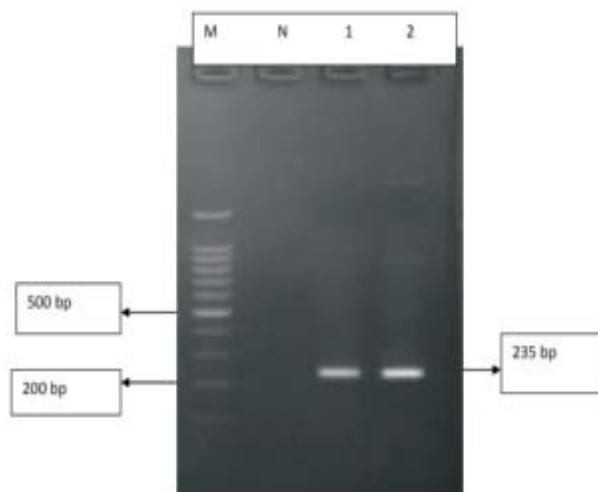
Proses kultur kembali pada penelitian ini menunjukkan bahwa isolat penelitian adalah benar bakteri *P. multocida*. Bakteri terlihat motil; menghasilkan indol, dan gas H₂S; tidak menggunakan sitrat; tidak menghasilkan enzim urease; dan memfermentasi glukosa (Lee *et al.*, 2016).



Gambar 1. (A) Hasil Pemeriksaan makroskopik *Pasturella multocida*.
Keterangan: Koloni Bakteri *P. multocida* berbentuk bulat, keputihan, transparan, berbau manis.
(B) Hasil Pemeriksaan mikroskopik. Keterangan: Bakteri *P. multocida* berbentuk coccobacillus (batang pendek), bersifat Negatif Gram dan bipolar.

Analisis PCR

PCR merupakan teknik uji molekuler yang cepat, kuat dan sangat spesifik untuk mengkonfirmasi banyak spesies termasuk *P. multocida* (OIE, 2008). Perkembangan pemeriksaan molekuler telah memberikan kesempatan untuk melakukan identifikasi dengan cepat dan spesifik dari agen infeksius, pada dasar tersebut penelitian ini menggunakan pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen penyandi *SodC* pada *P. multocida* tipe B:2 isolat lokal yang berasal dari BBVet Denpasar untuk mengetahui secara spesifik genom penyandi *SodC*. Patogenitas yang disebabkan oleh infeksi *P. multocida* dan sensitifitas inang kurang dipahami dengan baik (Harper *et al.*, 2006). Beberapa penelitian telah menentukan hubungan faktor virulensi dengan mekanisme patogen. Faktor Virulensi menunjukkan peranan penting dalam patogenitas penyakit pada bakteri pathogen dan faktor virulensi memiliki fungsi utamanya kompetensi, adherence, sintesis and ekspor kapsul, dan menghindari respon imun (Aski dan Tabatabaei, 2016). Penelitian ini telah memberikan informasi baru terhadap faktor virulensi dari gen penyandi *SodC* pada bakteri *P. multocida* yang ada di Indonesia. Penelitian sebelumnya memberikan hasil jika bakteri *P. multocida* positif memiliki gen penyandi *SodC*. Enzim

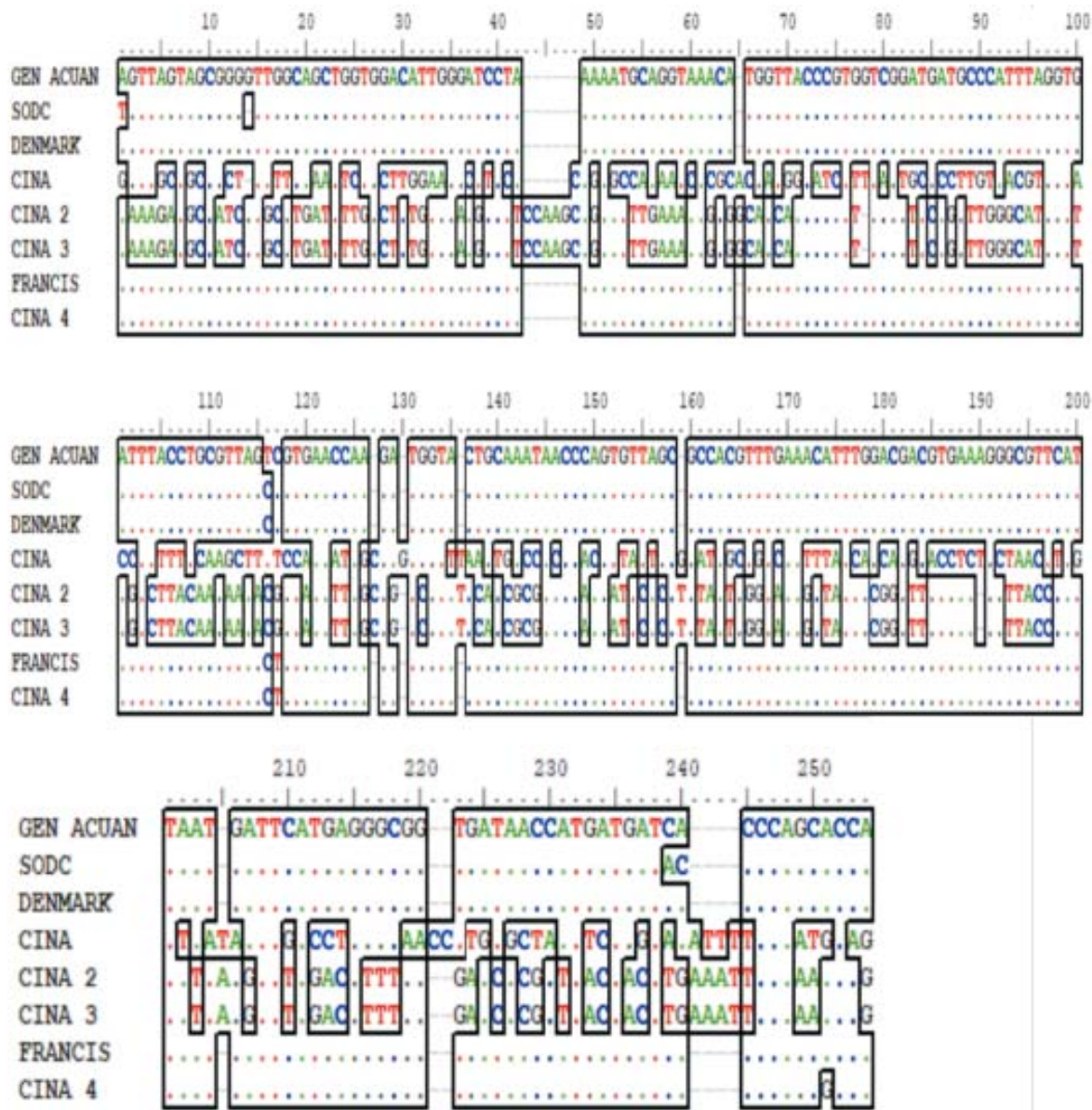


Gambar 2. Hasil *Polymerase Chain Reaction* Bakteri *Pasturella multocida* dari gen *SodC*.

Keterangan: Kolom M (marker): 100bp ladder (Vivantis); Kolom N : kontrol negatif; Kolom 1: Vaksin *P. multocida*; Kolom 2: Isolat lokal *P. multocida*.

(Superoxide Dismutase) yang dikodekan oleh gen ini memiliki fungsi sebagai antioksidan dan antifagositosis.

Hasil pemeriksaan PCR menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran kurang lebih



Gambar 3. Hasil *multiple alignment* sekuensing menggunakan Bioedit. Hasil ini menunjukkan homologi dengan tiga Negara, China, Denmark dan Perancis. Cina 1, 2, 3, 4 menunjukkan strain dari Isolat *Pasteurella multocida* yang diperoleh dari *GenBank*.

Tabel 1. Homologi isolat local bakteri *Pasterella multocida* dibandingkan dengan isolate referensi *GenBank*

No.	Strain	Negara	% Homologi
1	<i>P. multocida</i> strain 4407	Denmark	97
2	<i>P. multocida</i> strain 9N	China	98
3	<i>P. multocida</i> strain BS168	China	97
4	<i>P. multocida</i> strain EB168	China	97
5	<i>P. multocida</i> strain CIRMBP-0884	Perancis	97
6	<i>P. multocida</i> strain RCAD0259	China	96

Tabel 2. Perbandingan sekuen bakteri *Pasteurella multocida* isolat lokal NTT dengan isolat dari *GenBank*.

No.	Posisi Nukleotida	Isolat							Keterangan
		NTT	Den- mark	Cina 1	Cina 2	Cina 3	Fran ce	Cina 4	
1	14	-	G	-	-	-	G	G	Delesi
2	239	A	C	-	-	-	C	C	Mutasi titik
3	240	C	A	-	-	-	A	A	Mutasi titik
4	251	A	-	-	-	-	-	G	Mutasi titik

235 bp (Gambar 2) dengan ketebalan sama dan jumlah pita yang dihasilkan adalah satu. Hasil menunjukkan gen yang diidentifikasi ini merupakan gen penyandi *SodC* dari *P. multocida*. Hasil ini dilanjutkan dengan melakukan sekuensing dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk mengetahui panjang nukleotida (konsensus) dari gen penyandi *SodC* *P. multocida* isolat lokal.

Sekuensing dan Homologi Gen Penyandi

Sekuensing dilakukan di Laboratorium Institute of Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga (UNAIR). Hasil sekuensing *forward* gen penyandi *SodC* *Pasteurella multocida* adalah GGGCTGCGATCTAAATGCAGGTAAACATGGTTAC CCGTGGTTCGATGATGCCATTTAGGTGATTTACC T G C G T T A G C C G T G A A C C A A G A T G GTACTGCAAATAACCCAGTGTTAGCGCCA CGTTTGAAACATTTGGACGACGTGAAAGGGCG TICATTAATGATTCATGAGGGCGGIGATAACCAATGATGATA CCCAGCACCAA. Hasil sekuensing *reverse* gen penyandi *SodC* pada isolat lokal *P. Multocida* adalah CTCCTCTGATCTTAATGAC GCCCTTTCACGTTCGTCACAAATGTTTCAAACGTG GCGCTAACACTGGGTTATTTGCAGTACCAT CTTGGTTTCACGGCTAACG CAGGTAA ATCACCTAAATGGGCATCATCCGACCACG GGTAACCATGTTTACCTGCATTTTTAGG ATCCCAATGTCCACCAGCTGCCAA CCGCTACTAACATGAA. Hasil sekuensing *consensus* gen penyandi *SodC* pada isolat lokal *P. Multocida* adalah TGTTAGTAGCGGGTTG GCAGCTGGTGGACATTTGGGATCCTAAAAA TGCAGGTAAACATGGTTAACCGTG GTCGGTTTGAAACATTTGGACGA CGTGA AAGGGCGTTCATTAATGATTCATG AAGGGCGGTGATAACCATGATGATA CCCAGCACCCAGATGATGCCATTT A G G T G A T T T A C C T G C G T T A G C C G T G A A C C A A G A T G G T A CTGCAAATAACCCAGTGTTAGCGCCAC.

Gen penyandi *SodC* menunjukkan homologi dengan enam *P. multocida* yang ada di Gen Bank, yakni *P. multocida* strain 4407 Denmark (97%), *P. multocida* strain 9N China (98%), *P. multocida* strain BS168 China (97%), *P. multocida* strain EB168 China (97%), *P. multocida* subsp. *multocida* strain CIRMBP-0884 Perancis (97%) dan *P. multocida* subsp. *multocida* strain RCAD0259 China (96%). Pada Gambar 3 menunjukkan jika gen penyandi *SodC* ini memiliki homologi dengan 6 strain yang berasal dari Gen Bank, ada tiga strain (*P. multocida* strain 4407 Denmark (97%), *P. multocida* subsp. *multocida* strain CIRMBP0884 Perancis (97%), dan *P. multocida* subsp. *multocida* strain RCAD0259 China (96%) menunjukkan hasil susunan basa nucleotida yang sama dengan gen penyandi *SodC* isolat lokal sedangkan tiga strain dari isolat lainnya memiliki perbedaan pada susunan basa nucleotida (*P. multocida* strain 9N China (98%), *P. multocida* strain BS168 China (97%) dan *P. multocida* strain EB168 China (97%) (Tabel 1).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan antara *P. multocida* isolat lokal dengan data *P. multocida* yang ada di Gen Bank. Delesi terjadi pada urutan basa nukleotida 14, dan mutasi terjadi di titik urutan basa nuklotida 239, 240 dan 251 (Tabel 2).

SIMPULAN

Gen Penyandi *SodC* ditemukan pada isolat *P. multocida*. Hasil sekuensing menunjukkan panjang nukleotida gen penyandi *SodC* sebesar 235 nukleotida. Gen penyandi *SodC* *P. multocida* isolat lokal homolog dengan *SodC* *P. multocida* strain 4407 Denmark (97%), *P. multocida* subsp. *multocida* strain CIRMBP-0884 Perancis 65 (97%), dan *P. multocida* subsp. *multocida* strain RCAD0259 China (96%).

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendalami kembali gen virulensi dari bakteri *P. multocida* dari kota lain di Indonesia. Disamping itu, perlu adanya penelitian lanjutan terkait kandidat vaksin yang lebih optimal sehingga dapat membuat penyakit SE ini dapat dikendalikan penyebarannya dan infeksinya di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Balai Besar Veteriner Denpasar, Bali yang telah memberika fasilitas dan isolate untuk diteliti, serta kepada Institute Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga atas fasilitas laboratorium uji yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashari, Juarini E. 2007. *Kelestarian (herd survival) ternak kerbau di Aceh Barat Provinsi Nangroe Aceh Darussalam* (NAD). Bogor. Balai Penelitian Ternak.
- Aski HS, Tabatabaei M. 2016. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microb Pathog* 96: 52-57.
- Clarridge. 2004. Impact of 16s rRNA gen sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17(4): 840-62
- Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol* 114: 304-317.
- Harper M, Boyce JD, Adler B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265: 1-10.
- Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 144(1-2): 1-17
- Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Kulich P, Alexa P. 2006. Characterisation of *Pasteurella multocida* Isolats from Rabbits in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* 51(5): 278-283.
- Kuhnert P, Boerlino P, Emler S, Krawinklerfrey JM. 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subspecies septic by 16s rRNA gen sequencing. *Int J Med Microbiol* 290: 599-604.
- Lee KE, Choi HW, Jo HY, Kim HH, Yang DK. 2016. *Pasteurella multocida* isolation from pigs with respiratory disease in Korea. *Korean J Vet Res* 56: 37-40.
- Maulana FK. 2018. *Analisis homologi dan prediksi epitop gen penyandi 37 kDa Outer Membran Protein H (OmpH) Pasteurella multocida tipe B isolat lokal asal Nusa Tenggara Timur* (NTT). Surabaya. Program Studi Magister. Universitas Airlangga.
- OIE. 2008. OIE Terrestrial Manual (Chapter 2.3.9). Hlm. 524.
- OIE. 2009. Haemorrhagic Septicaemia. the center for food security & public health. institute for international cooperation in animal biologics. OIE Collaborating Center. Hlm. 1-5.
- Priadi A, Natalia L. 2000. Patogenesis SE pada sapi bali dan kerbau. Gejala klinis, perubahan patologis, reisolasi, deteksi *P. multocida* dengan metode kultur dan PCR. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(1): 65-71
- Putra AAG. 2006. *Situasi penyakit hewan menular strategis pada ruminansia besar: surveilans dan monitoring*. Denpasar. Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional VI Denpasar, Bali.
- Siska AP. 2018. Deteksi, homologi dan prediksi epitop gen penyandi kapsular *Pasteurella multocida* dari isolat kerbau asal NTT (Nusa Tenggara Timur). Fakultas Kedokteran Hewan. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA: Molecular evolutionary genomics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.