

## Orientasi Dosis Iradiasi *Streptococcus agalactiae* untuk Bahan Vaksin Mastitis Subklinis pada Sapi Perah

### *Orientation of Streptococcus agalactiae Irradiation Dose for Subclinical Mastitis Vaccine in Dairy Cows*

B.J. Tuasikal<sup>1</sup>, S. Estuningsih<sup>2</sup>, F.H. Pasaribu<sup>2</sup> dan I.W.T. Wibawan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Diterima 08 Mei 2012; Disetujui 18 Oktober 2012

#### ABSTRAK

**Orientasi Dosis Iradiasi *Streptococcus agalactiae* untuk Bahan Vaksin Mastitis Subklinis pada Sapi Perah.** Telah dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma dalam melemahkan *Streptococcus agalactiae* sebagai bahan vaksin untuk pencegahan penyakit Mastitis subklinis (radang ambing) pada sapi. Bakteri *S. agalactiae* yang telah diisolasi dari kasus Mastitis subklinis pada sapi perah di lapangan, kemudian diamati pertumbuhannya. Bakteri ini yang telah mencapai pertengahan fase log dari pertumbuhannya, dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yang diiradiasi dengan dosis 0; 25; 50; 75; dan 100Gy. Bakteri yang telah diiradiasi selanjutnya ditanam pada media agar *Brain Heart Infusion (BHI)*, untuk dilakukan penghitungan koloni bakteri bagi penentuan LD<sub>50</sub>-nya. Dari perlakuan tersebut diperoleh kurva Pengaruh Iradiasi terhadap % Viabilitas bakteri dengan persamaan  $Y = 95,414e^{-0,0371X}$ ;  $R^2 = 0,9979$  ( $Y = \% \text{Viabilitas}$  dan  $X = \text{dosis iradiasi}$ ). Dari perhitungan ini diketahui dosis iradiasi sebesar 17,4 Gy untuk melemahkan bakteri *S. agalactiae* sampai taraf LD<sub>50</sub>.

**Kata kunci :** *Streptococcus agalactiae*, iradiasi, vaksin, mastitis subklinis

#### ABSTRACT

**Orientation of *Streptococcus agalactiae* irradiation dose for subclinical mastitis vaccine in dairy cows.** An experiment to determine the effect of gamma-ray irradiation in debilitating *Streptococcus agalactiae* as a cause of subclinical mastitis (inflammation of the udder) in cows has been conducted. *S. agalactiae* bacteria was isolated from subclinical mastitis found in dairy cows in the field was then observed for its cell growth. The bacteriae which have reached mid-log phase of growth, were divided into 5 treatment groups, of which each was irradiated at dose level of 0; 25; 50; 75; and 100Gy. Irradiated bacteria subsequently were grown on Brain Heart Infusion agar (BHI), and each of its colonies was counted for LD<sub>50</sub> determination. The obtained curves from irradiated treatment bacterial shown viability percentage by the linier equation of  $Y = 95.414 e^{-0,0371X}$ ;  $R^2 = 0.9979$ , while  $Y = \% \text{viability}$  and  $X = \text{dose of irradiation}$ . The calculation done in this experiment shows that irradiation dose of 17.4 Gy weaken the bacteria patogenicity of *S. agalactiae* to the level of LD<sub>50</sub>.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*, irradiation, vaccine, subclinical mastitis

#### PENDAHULUAN

Usaha peternakan di Indonesia mempunyai potensi untuk dapat berkembang pesat, mengingat cukupnya ketersediaan pakan dan keragaman jenis

ternak yang ada. Meningkatnya kesadaran masyarakat tentang nilai gizi serta kebutuhan konsumsi masyarakat akan protein hewani, juga turut mendukung berkembangnya usaha peternakan rakyat. Salah satu upaya pemerintah untuk

meningkatkan konsumsi protein hewani bagi penduduk Indonesia adalah dengan mengembangkan peternakan sapi perah, yang telah dimulai sejak zaman Hindia Belanda hingga saat ini [1]. Kendala yang sering menghambat keberhasilan suatu usaha peternakan adalah serangan penyakit. Salah satu penyakit penting yang dapat menurunkan produksi susu pada ternak sapi perah adalah Mastitis yang dikenal juga sebagai penyakit radang kelenjar air susu (ambing). Penyakit ini dibagi menjadi 2 tipe, pertama yaitu mastitis klinis yang menunjukkan gejala kesakitan pada ambing ternak maupun kerusakan pada susu, dan kedua adalah mastitis subklinis yang tidak menampilkan gejala peradangan pada ambing kecuali bila dilakukan pemeriksaan pada air susu dengan uji khusus contohnya *California Mastitis Test* [2]. Sebagaimana negara-negara lain, di Indonesia-pun kasus yang lebih banyak terjadi yaitu mastitis subklinis [3, 4, 5]. Kasus mastitis terutama mastitis subklinis di Indonesia yang ditemukan sampai akhir tahun 2006, tercatat sekitar 75% - 83% [6]. Mastitis subklinis pada sapi perah dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar terhadap peternak [7], yaitu berupa penurunan produksi susu, penurunan kualitas susu yang mengakibatkan penolakan susu oleh pengumpul, penurunan kualitas hasil olahan susu, peningkatan biaya perawatan dan pengobatan, serta pengafkiran ternak lebih awal [8]. Kasus mastitis yang menyerang peternakan sapi perah di Kabupaten Garut dapat menurunkan produksi susu lebih dari 20 % [9]. Bahkan menurut BLOOD dan RADOSTITS [10] dan EUSTICE [11], kerugian ekonomi akibat mastitis antara lain adalah akibat penurunan keseluruhan produksi susu di peternakan yang dapat mencapai 70%. Ambing sapi yang terinfeksi pada peternakan di Amerika menyebabkan fihak industri susu harus mengeluarkan biaya hampir dua milyar dolar per-tahun, dan keadaan yang serupa juga terjadi di Eropa [12].

Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa bakteri *Streptococcus agalactiae*

merupakan bakteri dominan penyebab mastitis subklinis di peternakan sapi perah kecamatan Cisurupan, Cilawu dan Bayongbong, Kabupaten Garut [13]. Sesuai hasil identifikasi Balai Besar Penelitian Veteriner (BBALITVET) memperoleh 60,6% *S. agalactiae* pada kasus mastitis subklinis di daerah Bandung, Bogor, dan Sukabumi, sebagai bakteri terbanyak yang diisolasi [14]. Pengobatan mastitis dengan menggunakan antibiotik terutama ditujukan untuk membunuh bakteri, namun dengan banyaknya macam obat antibiotik yang dipergunakan dan cara pemberian dosis yang tidak terkontrol, maka dikhawatirkan menimbulkan permasalahan baru berupa resistensi kuman penyebab mastitis dan terdapat residu antibiotik pada susu yang dihasilkan. Oleh karena itu bakteri mastitis menjadi lebih sulit diberantas, dan residu antibiotik pada susu berpotensi membahayakan kesehatan manusia [15].

Dengan adanya masalah resistensi bakteri terhadap antibiotik dan residunya pada susu, maka dipandang perlu untuk mencari alternatif lain untuk pencegahan penyakit ini, salah satunya adalah dengan pembuatan vaksin. Pemanfaatan iradiasi dimaksudkan untuk melemahkan patogenitas *Streptococcus agalactiae* sebagai bakteri dominan penyebab mastitis, namun bakteri ini diharapkan masih dapat menimbulkan respon tanggap kebal sebagai bahan vaksin. Sehubungan dengan masalah tersebut di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mencari kisaran dosis radiasi untuk melemahkan *S. agalactiae* sampai taraf inaktif 50% atau *Lethal dose-50* ( $LD_{50}$ ) sebagai bahan vaksin untuk pencegahan mastitis subklinis pada sapi perah.

## BAHAN DAN METODA

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni bakteri *Streptococcus agalactiae* yang dikoleksi dari kasus mastitis subklinis di lapangan setelah diuji positif terhadap *California Mastitis Test*

(CMT), dan pengelompokan dengan *Streptococcal grouping kit*. Bakteri *Streptococcus* ini termasuk ke dalam grup B (SGB). Medium yang digunakan untuk pertumbuhan *S. agalactiae* yaitu *Brain Heart Infusion* (BHI) agar dan *broth* produk Oxoid™ dengan akuades steril sebagai pelarut. Zat kimia yang digunakan terdiri dari alkohol 70%, spirtus, dan NaCl fisiologis (0,85%) steril. Peralatan yang digunakan berupa alat gelas seperti tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas piala, cawan petri, batang sprider, pipet, peralatan lain seperti öse, bunsen, rak tabung, timbangan, spektrofotometer, kuvet, autoklaf, inkubator, inkubator goyang, *laminar air flow* dan iradiator *Gamma chamber* dengan sumber isotop <sup>60</sup>Co di PATIR-BATAN sebagai sarana iradiasi.

### **Pembuatan kurva tumbuh bakteri *S. agalactiae***

Isolat bakteri murni *S. agalactiae* dipermuda dengan cara dipindahkan 1 öse kedalam medium BHI agar miring, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang telah dipermuda diambil 5 öse, kemudian diinokulasikan kedalam 50 mL BHI Broth, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C sambil dilakukan agitasi 120 rpm di dalam inkubator goyang. Pertumbuhan biakan diamati dengan mengukur densitas optik (*Optical Density*, OD) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm, dengan selang waktu 60 menit hingga memasuki fase stasioner [16]. Bakteri yang tumbuh dengan nilai absorbansi pada OD mencapai pertengahan fase logaritma, digunakan sebagai bahan pembuatan vaksin mastitis diiradiasi.

### **Orientasi dosis iradiasi untuk *lethal dose 50%* (LD<sub>50</sub>)**

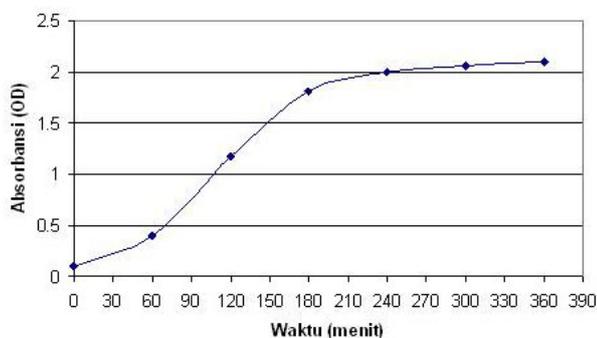
Bakteri yang telah mencapai pertengahan fase logaritma tersebut di atas, selanjutnya dicuci sebanyak 3 kali dengan akuades steril menggunakan sentrifus pada 10.000 rpm. Pelet yang terbentuk di dasar tabung sentrifus dilarutkan dalam NaCl fisiologis steril sehingga diperoleh

konsentrasi 10<sup>8</sup>sel/mL dengan cara disamakan kekeruhannya pada larutan standar Barium yang setara dengan larutan bakteri 10<sup>8</sup>sel/mL. Larutan *S. agalactiae* tersebut dibagi ke dalam 5 tabung kemudian diiradiasi dengan sinar gamma dengan dosis radiasi masing-masing 25; 50; 75; dan 100 Gy, sedangkan tabung berisi larutan bakteri tanpa iradiasi (0 Gy) digunakan sebagai kontrol. Iradiator *Gamma chamber*, yang digunakan pada saat proses iradiasi dilakukan, mempunyai laju dosis 112,504 krad/jam. Setelah diiradiasi, masing-masing larutan bakteri diencerkan berseri dari 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-10</sup>. Selanjutnya bakteri ditanam pada medium agar padat BHI dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C, selanjutnya dilakukan penghitungan koloni bakteri untuk penentuan *Lethal Dose 50%* (LD<sub>50</sub>) yang dipetakan pada kurva persentasi viabilitas bakteri yang bertahan hidup pasca iradiasi.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pembuatan kurva tumbuh perlakuan digunakan untuk melihat pertumbuhan isolat bakteri sebelum diiradiasi. Bila suatu pembenihan cairan kuman yang berasal dari suatu biakan yang sebelumnya telah tumbuh sampai jenuh, kemudian jumlah sel-sel hidup ditentukan secara berkala dan digambarkan dalam bentuk grafik maka akan diperoleh suatu kurva pertumbuhan. Kurva ini dapat dibagi ke dalam 4 fase yaitu fase lag (adaptasi), fase log (logaritmik atau eksponensial), fase stasioner (seimbang) dan fase kematian (penurunan) [17]. Pada fase lag atau adaptasi, suatu massa dalam sel-sel bakteri yang kekurangan metabolit dan enzim sebagai akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan terdahulu, menyesuaikan diri dalam lingkungannya yang baru. Pada fase pertama ini, tidak ada penambahan populasi bakteri karena hanya terjadi penambahan substansi intraseluler, sel mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi dan bertambah ukurannya saja. Pada grafik pertumbuhan

bakteri, fase lag ini biasanya ditunjukkan dengan garis horizontal pada awal pertumbuhannya. Memasuki fase logaritma, sel sel membelah dengan laju konstan, massa menjadi dua kali lipat dengan laju sama dan aktivitas metabolik konstan. Pada grafik pertumbuhan bakteri, fase log ditunjukkan dengan garis meningkat sebagai fungsi eksponensial. Setelah nutrisi menyusut dan habis digunakan saat pembelahan sel, maka terjadi kematian beberapa sel dan sebagian yang masih hidup tetap tumbuh dan membelah sehingga jumlah sel hidup menjadi stabil, dengan demikian bakteri memasuki fase stasioner dan grafik pertumbuhan membentuk garis cenderung mendatar. Pada fase terakhir terjadi kematian sel yang lebih cepat dari pada terbentuknya sel-sel baru. Laju kematian mengalami percepatan menjadi grafik pertumbuhan menurun kembali. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan sampai fase kematian. Hal ini dibutuhkan sebagai dasar pembuatan bahan vaksin aktif yang harus berasal dari bakteri hidup.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *S. agalactiae* untuk bahan vaksin radiasi mastitis.

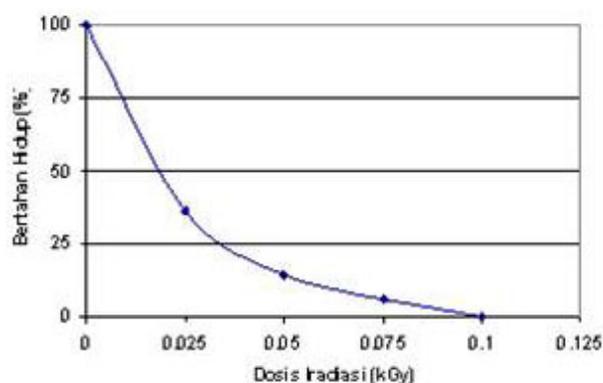
Berdasarkan hasil pengamatan pola pertumbuhan isolat bakteri *S. agalactiae* dalam medium BHI broth sebagaimana terlihat pada Gambar 1. menunjukkan bahwa bakteri ini mengalami fase adaptasi selama 1 jam (60 menit). Pada fase penyesuaian, yaitu sekitar 1 sampai 2 jam setelah pemindahan, bakteri biasanya belum mengadakan pembiakan [18]. Pertumbuhan

bakteri pada pertengahan fase log dicapai setelah inkubasi selama 150 menit (2,5 jam). Bakteri yang tumbuh pada pertengahan fase log digunakan sebagai bahan vaksin untuk iradiasi, karena pada fase ini sel bakteri masih aktif membelah diri dalam masa pertumbuhannya.

Dari orientasi dosis iradiasi untuk melemahkan bakteri diperoleh hasil pengamatan koloni bakteri pada Tabel 1. Dari perlakuan tersebut diperoleh kurva Pengaruh Iradiasi terhadap % Viabilitas bakteri dengan persamaan  $Y = 95,414e^{-0,0371X}$ ;  $R^2 = 0.9979$  ( $Y = \%Viabilitas$  dan  $X =$  dosis iradiasi) yang terdapat pada Gambar 2. Dari persamaan tersebut dapat diperoleh dosis iradiasi 17,4 Gy untuk melemahkan bakteri *Streptococcus agalactiae* sampai taraf  $LD_{50}$ .

**Tabel 1.** Pengamatan jumlah sel bakteri *S. agalactiae* untuk  $LD_{50}$  akibat radiasi sinar gamma pada dosis 0; 25; 50; 75; 100 Gy (rata-rata dari 3 kali ulangan).

Dosis (Gy)	Jumlah sel/ml	% viabilitas	Keterangan
0	$16,90 \times 10^8$	100	$LD_{50} - 8,45 \times 10^8$
25	$6,10 \times 10^8$	36,1	
50	$2,40 \times 10^8$	14,2	
75	$1,05 \times 10^8$	6,21	
100	0	0	



**Gambar 2.** Persentase bakteri *S. agalactiae* yang bertahan hidup akibat iradiasi sinar gamma pada dosis 0; 25; 50; 75; 100 Gy.

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 2, iradiasi sinar gamma dapat mempengaruhi jumlah sel bakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa semakin tinggi dosis iradiasi semakin rendah jumlah populasi sel bakteri yang dapat bertahan hidup [19]. Radiasi pengion sinar gamma atau elektron berenergi tinggi dapat menimbulkan efek biologis langsung pada mikroba, terutama pada molekul-molekul kunci seperti pada asam deoksiribonukleat atau DNA. Dengan adanya efek langsung tersebut bakteri tidak mempunyai enzim penyembuh yang efektif untuk dapat memperbaiki kerusakan pada asam deoksiribonukleatnya. Adapun efek tak langsung dari radiasi pada mikroba umumnya disebabkan oleh produk-produk radiolisis dari air yang berada di dalam dan di luar sel mikroorganisme. Selanjutnya radikal-radikal bebas yang dihasilkan akan bereaksi dengan molekul biologi yang penting seperti basa dan rantai DNA, asam amino dan protein [20]. Namun demikian, akibat radiasi pada bakteri *S. agalactiae* perlu dikaji lagi, terutama kemungkinan kerusakan pada rantai DNA-nya. Uji lanjutan perlu dilakukan pada hewan percobaan untuk membuktikan jika iradiasi yang dapat merusak DNA *S. agalactiae* menjadi tidak patogen, tapi masih mampu merangsang timbulnya daya tahan terhadap bakteri tersebut.

## KESIMPULAN

1. Iradiasi sinar gamma dapat melemahkan bakteri *S. agalactiae* sebagai bahan vaksin untuk pencegahan mastitis subklinis, namun demikian kemampuannya untuk menimbulkan tanggapan kebal pada ternak masih harus diteliti lebih lanjut.
2. Berdasarkan kurva pengaruh iradiasi terhadap % Viabilitas bakteri dengan persamaan  $Y = 95,414e^{-0,0371X}$  ;  $R^2 = 0,9979$  ( $Y = \% \text{Viabilitas}$  dan  $X = \text{dosis iradiasi}$ ), dapat diketahui bahwa dosis iradiasi berkisar 17,4 Gy untuk melemahkan bakteri *S. agalactiae* sampai taraf  $LD_{50}$

untuk pembuatan vaksin hidup *S. agalactiae*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. SUBANDRIYO dan ADIARTO, Sejarah Perkembangan Peternakan Sapi Perah, Profil Usaha Peternakan Sapi Perah di Indonesia, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor, 1 - 25 (2009).
2. MANUAL PENYAKIT HEWAN MAMALIA, "Mastitis", Departemen Pertanian, Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan, Direktorat Kesehatan Hewan, Jakarta, 175 - 177 (2001).
3. SUPAR, Mastitis Subklinis pada Sapi Perah di Indonesia: Masalah dan Pendekatannya, Wartazoa Vol. 6, No. 2, 48 - 52 (1997).
4. SUBBRONTO, Ilmu Penyakit Ternak I., Edisi Kedua, Gadjah Mada University Press., Yogyakarta, 309 - 351 (2003).
5. HASHEMI, M., KAFI, M., and SAFDARIAN, M., The Prevalence of Clinical and Subclinical Mastitis in Dairy Cows in The Central Region of Fars Province, South of Iran., Iranian Jour. Of Vet. Res., Shiraz University, Vol. 12, No. 3, Ser. No. 36, 236 - 241 (2011).
6. SUDARWANTO, M., H. LATIF, and M. NOORDIN, The Relationship of The Somatic Cell Counting to Subclinical Mastitis and to Improve Milk Quality., 1<sup>st</sup> International AAVS Scientific Conference, Jakarta, July 12-13 (2006).
7. WU, JUNQIANG., SONGHUA HU, and LITING CAO., Therapeutic Effect

- of Nisin Z on Subclinical Mastitis in Lactating Cows., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 51, No. 9, 3131 - 3135 (2007).
8. SUDARWANTO, M., dan E. SUDARNIKA., Hubungan antara pH Susu dengan Jumlah Sel Somatik Sebagai Parameter Mastitis Subklinik., Media Peternakan, Vol. 31, No. 2, 107 - 113 (2008).
  9. PERSONAL KOMUNIKASI, Data Koperasi Susu, Kecamatan Cisarupan, Kabupaten Garut (2005).
  10. BLOOD, D.C., dan RADOSTITS, O.M., Mastitis, Veterinary Medicine, 7<sup>th</sup> Ed. Bailliere, Thindall, Philadelphia, 537-549(1989).
  11. EUSTICE, R.F., Faktor-faktor yang mempengaruhi lemahnya daya tahan terhadap mastitis., Pedoman Pengelolaan Sapi Perah, Nandi Amerta Agung, Salatiga, 171-189 (1988).
  12. DONOVAN, DM., KERR DE, and WALL RJ., Engineering Disease Resistant Cattle., Transgenic Res., 14, 563 - 567 (2005).
  13. TJIPTOSUMIRAT, T., A. P. MURNI, B. J. TUASIKAL, Peningkatan efisiensi reproduksi dengan aplikasi teknik Radioimmuno Assay (RIA) dan identifikasi bakteri mastitis pada ternak ruminansia, Laporan Teknis Litbang T.A. 2001, P3TIR, BATAN, Jakarta.
  14. SUPAR dan T. ARIYANTI, Kajian Pengendalian Mastitis Subklinik pada Sapi Perah., Pros. Semiloka Nas. Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020., PUSLITBANGNAK, BALITBANGTAN, DEPTAN, Bogor, 360 - 366 (2008).
  15. CHOTIAH, S., Hubungan antara produksi  $\beta$ -Laktamase dengan suseptibilitas terhadap Penisilin dan Ampisilin pada *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* isolate local berasal dari susu sapi Mastitis., Penyakit Hewan, XXV (45), 15 - 19 (1993).
  16. KHODIJAH, S., B.J. TUASIKAL, I. SUGORO, YUSNETI, Pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* sebagai Bakteri Penyebab Mastitis Subklinik pada Sapi Perah., Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, BALITBANGNAK, Bogor, 233 - 238 (2006).
  17. QUIN, P.J., B.K. MARKEY, M.E. CARTER, W.J.C. DONELLY, F.C. LEONARD., "Cultivation, preservation and inactivation of bacteria"., Veterinary Microbiology and Microbial Disease., Blackwell Publishing, UK, 12 - 14 (2006).
  18. DWIDJOSEPUTRO, D., "Pembiakan dan Pertumbuhan Bakteri"., Dasar-dasar Mikrobiologi, Penerbit Djambatan, Jakarta, Cetakan ke-17, 57 - 68 (2010).
  19. TUASIKAL, B. J., I. SUGORO, T. TJIPTOSUMIRAT, M. LINA., Pengaruh iradiasi sinar gamma pada pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* sebagai bahan vaksin penyakit Mastitis pada sapi perah., Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia, Vol. IV, Edisi Khusus 2: 137-149 (2003).
  20. HILMY, N., The application of nuclear science and technology for human welfare., Proc. Of The Public. Inform. Seminar Jointly Organized by IAEA and BATAN, Jakarta, 121 - 140 (2001).