

PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA PADA PERTUMBUHAN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* SEBAGAI BAHAN VAKSIN PENYAKIT MASTITIS PADA SAPI PERAH

B. Jeanne Tuasikal, I. Sugoro, T. Tjiptosumirat, M. Lina.
Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi-BATAN.

ABSTRAK

PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA PADA PERTUMBUHAN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* SEBAGAI BAHAN VAKSIN PENYAKIT MASTITIS PADA SAPI PERAH. Suatu penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma dalam melemahkan *S. agalactiae* sebagai bakteri dominan penyebab mastitis pada sapi perah. Penelitian ini bertujuan memperoleh dosis iradiasi yang tepat untuk bahan pembuatan vaksin mastitis iradiasi. Bakteri *S. agalactiae* yang telah mencapai pertengahan fase log dari pertumbuhannya dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, dan masing-masing diiradiasi dengan dosis 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 kGy. Setelah ditanam pada medium BHI agar, dilakukan penghitungan koloni bakteri untuk penentuan LD₅₀-nya. Hasil penghitungan koloni *S. Agalactiae* adalah masing-masing $7,5 \times 10^8$; $5,0 \times 10^7$; $7,0 \times 10^6$; $9,5 \times 10^5$; $1,5 \times 10^4$; dan $3,5 \times 10^3$ sel/mL. Dari pengamatan hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis iradiasi semakin rendah jumlah sel/mL yang masih bertahan hidup dan LD₅₀ di bawah dosis 0,2 kGy.

Kata kunci: iradiasi gamma, *streptococcus agalactiae*, mastitis.

ABSTRACT

EFFECT OF GAMMA RAY IRRADIATION ON *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GROWTH FOR VACCINE AGENT OF MASTITIS DISEASE IN DAIRY CATTLE. A study has been conducted to determine the effect of gamma ray irradiation to attenuate infectivity of *S. agalactiae* as dominant bacteria causing mastitis in dairy cattle. The aim of the study is obtaining optimum irradiation dosage to provide radio vaccine for mastitis. *S. agalactiae* isolate bacteria of which has reach the mid log-phase was cultured and divided into 6 treatment groups of irradiation doses, *i.e.* 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 kGy. Following irradiation, bacteria were then cultured in BHI agar media for colony counting to determine the LD₅₀, resulting 7.5×10^8 ; 5.0×10^7 ; 7.0×10^6 ; 9.5×10^5 ; 1.5×10^4 ; and 3.5×10^3 cell/mL, respectively. Result of this study shows the higher irradiation doses the lower number of bacteria per mL and LD₅₀, which found to be under 0.2 kGy of irradiation dose.

Key words: gamma irradiation, *steptococcus agalactiae*, mastitis.

PENDAHULUAN

Usaha peternakan di Indonesia mempunyai potensi berkembang dengan 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. Hal ini terlihat dengan meningkatnya populasi sapi perah dari tahun ke tahun, yaitu dari 94.000 ekor pada awal PELITA III (1979) menjadi 288.000 ekor pada awal pelita V, tahun 1989 [1], terus meningkat menjadi 368.490 pada awal tahun 2001 [2]. Peningkatan populasi sapi perah ini juga diikuti dengan produksi susunya, yaitu pada tahun 1979 produksi susu hanya 72.200 ton meningkat menjadi 338.200 ton pada tahun 1989 dan 505.000 ton pada awal tahun 2001 [2]. Walaupun demikian dirasakan bahwa produksi susu dalam negeri masih relatif rendah, karena produksi susu ini disamping untuk memenuhi konsumsi dalam negeri juga dimaksudkan untuk mengurangi impor susu atau sebagai substitusi impor. Oleh karena itu perlu terus diupayakan peningkatan produktivitas dari ternak perah yang ada.

Salah satu faktor penyebab rendahnya produktivitas sapi perah di Indonesia adalah masalah penyakit, terutama penyakit mastitis yang banyak menyerang sapi perah. Mastitis adalah penyakit dengan gejala peradangan pada kelenjar air susu (ambing). Akibat mastitis maka terjadi penurunan produksi air susu, hal ini merupakan masalah bagi peternak sapi perah Indonesia yang umumnya hanya memelihara 3-4 ekor sapi tiap peternak. Menurut MORRIS [3] bila ternak terserang mastitis pada salah satu kuartir dari keempat ambingnya, maka akan menurunkan produksi untuk

keseluruhan ambing sebesar 30 %, dan untuk keseluruhan produksi susu sebesar 10-15 %. Kasus mastitis yang menyerang peternakan sapi perah di Kabupaten Garut dapat menurunkan produksi susu lebih dari 20 % [4]. Bahkan menurut BLOOD dan RADOSTITS [5] dan EUSTICE [6], bahwa kerugian ekonomi akibat mastitis antara lain akibat penurunan keseluruhan produksi susu di peternakan bisa mencapai 70 %.

Penyakit mastitis secara garis besar dikenal 2 macam, yaitu mastitis klinis dan mastitis subklinis. Untuk mendiagnosis mastitis klinis tidaklah sukar, karena disertai dengan tanda-tanda klinis seperti pembengkakan pada ambing, kemerahan, panas dan sebagainya, sedangkan untuk mendiagnosis mastitis yang subklinis agak sukar sebab tanpa disertai gejala klinis. Menurut HIRST dkk [7] prevalensi mastitis di Jawa Barat dan Jawa Timur adalah 5 % untuk mastitis klinis dan 67 % kasus mastitis subklinis. Prevalensi mastitis subklinis di Boyolali Jawa Tengah sebesar 62,5 % [8], sedangkan di Yogyakarta prevalensi mastitis subklinis 36,9 % dan mastitis klinis 10,7 % [9]. Dari data tersebut terlihat bahwa mastitis subklinis kasusnya jauh lebih tinggi dan dapat menimbulkan kerugian yang cukup besar bila tidak segera ditangani.

Mastitis dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yakni cara pemerahan yang salah, sanitasi yang buruk, kandang yang kurang bersih, dan lantai kandang yang tidak memenuhi persyaratan untuk sapi perah. Penyebaran penyakit ini dapat melalui pemerahan yang tidak mengindahkan kebersihan, alat pemerahan, kain pembersih puting dan pencemaran dari lingkungan kandang yang kotor. Hal tersebut umumnya justru terdapat di daerah kantong sapi perah dengan kondisi kekurangan air, sehingga untuk menjaga kebersihan sapi juga sulit dilaksanakan [10].

Dari kondisi kandang yang kotor, kuman penyebab mastitis masuk ke dalam ambing melalui lubang dan kanal puting saat pemerahan atau ketika sapi duduk di lantai kandang. Kuman yang potensial menyebabkan mastitis adalah *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* dan *Staphylococcus*

aureus [11]. Kuman lain yang secara sporadik dapat menginfeksi adalah *Coliforms*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma sp.*, dan *Leptospira sp.* Jamur dan ragi juga dapat menyebabkan mastitis tapi sangat jarang. Penyebab lain adalah kuman lingkungan seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella* dan *Enterobacter aerogenes*. Hasil isolasi dan identifikasi dari kasus mastitis di Kecamatan Cilawu dan Cisurupan, Kabupaten Garut diperoleh bakteri dominan penyebab mastitis di daerah tersebut adalah *Streptococcus agalactiae* dan *Staphylococcus aureus* [12].

Untuk mengatasi permasalahan mastitis telah digunakan berbagai macam antibiotik seperti penisilin, ampisilin, kloksasilin, golongan tetrasiklin, dan lain sebagainya. Pengobatan mastitis dengan menggunakan antibiotik terutama ditujukan untuk membunuh bakteri, namun dengan banyaknya macam antibiotik yang dipergunakan dan cara pemberian dosis yang tidak terkontrol, maka dikhawatirkan menimbulkan permasalahan baru berupa resistensinya kuman penyebab mastitis dan masalah residu obat pada susu yang dihasilkan. Keberadaan residu antibiotik pada susu yang akan dikonsumsi dapat menyebabkan terjadinya reaksi alergi dan gangguan terhadap mikroflora saluran pencernaan dari manusia yang mengkonsumsi susu tersebut. Bahkan pada susu yang akan diekspor diharuskan bebas dari residu antibiotik oleh negara pengimpor. Penggunaan dan pemilihan antibiotik yang tidak tepat, ditinjau dari aspek indikasi, dosis, waktu dimulainya dan lamanya terapi, serta penggunaan kombinasi antibiotik dapat mempercepat terjadinya resistensi [13].

Sebenarnya peternak sudah mengetahui cara pencegahan penyakit ini. Selain sistem pemeliharaan dan manajemen pemerahan yang baik, dikenal suatu cara yang disebut *teat deeping*, yaitu pencelupan puting susu beberapa saat dalam larutan iodium setelah pemerahan. Namun demikian kasus mastitis masih saja banyak terjadi di Indonesia. Dengan adanya masalah resistensi kuman mastitis terhadap antibiotik dan

residunya pada susu, maka dipandang perlu untuk mencari alternatif lain untuk pencegahan penyakit ini, salah satunya dengan pembuatan vaksin. Penelitian ini bertujuan memperoleh dosis iradiasi *Streptococcus agalactiae* yang tepat untuk bahan pembuatan vaksin mastitis iradiasi. Pemanfaatan iradiasi dimaksudkan untuk melemahkan patogenitas *Streptococcus agalactiae* sebagai bakteri dominan penyebab mastitis di Kabupaten Garut, namun bakteri ini diharapkan masih dapat menimbulkan respon tanggap kebal sebagai bahan vaksin. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk mendukung peningkatan efisiensi reproduksi dan produksi sapi perah melalui perbaikan kesehatan ternak.

TATA KERJA

Bahan dan Peralatan

Isolat murni bakteri *Streptococcus agalactiae* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kasus mastitis di Kecamatan Cilawu, Kabupaten Garut. Medium untuk pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* yaitu *Brain Heart Infusion (BHI) Agar* dan *Broth* produk *Oxoid™* dengan aquades steril sebagai pelarut. Zat kimia terdiri dari alkohol 70%, spirtus dan NaCl fisiologis steril. Peralatan yang digunakan berupa alat-alat gelas seperti tabung reaksi, erlenmeyer, gelas piala, cawan petri, batang *spreader*, pipet, tabung sentrifuga. Peralatan lain adalah ose, bunsen, rak tabung, sentrifuga Sorval 4⁰C, timbangan, spektrofotometer, kuvet, inkubator, inkubator goyang, otoklaf, *laminar air flow*, iradiator *gamma chamber*, P3TIR – BATAN.

Penyiapan bakteri. *Streptococcus agalactiae*

Isolat bakteri *S. agalactiae* yang teridentifikasi dalam medium agar padat *BHI* berumur 1 hari, diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam 10 mL medium cair *BHI* dan

diinkubasi semalam pada suhu 37°C sambil dilakukan agitasi 120 rpm. Kemudian sebanyak 1 mL biakan tersebut diinokulasikan ke dalam 100 mL medium cair BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C sambil dilakukan agitasi 120 rpm. Pertumbuhan biakan diamati dengan mengukur densitas optik (*Optical Density*, OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Bakteri yang tumbuh dengan OD mencapai pertengahan fase log akan digunakan sebagai bahan vaksin mastitis iradiasi.

Penentuan dosis iradiasi sebagai *lethal dose* 50% (LD50)

Bakteri yang telah mencapai pertengahan fase log tersebut di atas, selanjutnya dicuci dengan akuades steril menggunakan sentrifus pada 1000 rpm sebanyak 3 kali. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam NaCl fisiologis steril sehingga diperoleh konsentrasi 3×10^8 sel/mL dengan cara disamakan kekeruhannya dengan larutan standar berisi 3×10^8 sel/mL yang telah tersedia pada tabung reaksi tertutup [14]. Larutan bakteri tersebut dibagi ke dalam 5 tabung kemudian diiradiasi dengan sinar gamma (laju dosis 23 kGy / jam) dengan dosis radiasi masing-masing 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 kGy. Larutan bakteri tanpa iradiasi (0 kGy) digunakan sebagai kontrol. Setelah diiradiasi, masing-masing larutan bakteri diencerkan berseri dari 10^{-1} sampai 10^{-7} . Selanjutnya bakteri ditanam pada medium agar padat BHI dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan penghitungan koloni bakteri untuk penentuan *Lethal Dose* 50% (LD₅₀). Percobaan dilakukan dengan perlakuan dosis radiasi 6 taraf dan ulangan sebanyak 3 kali.

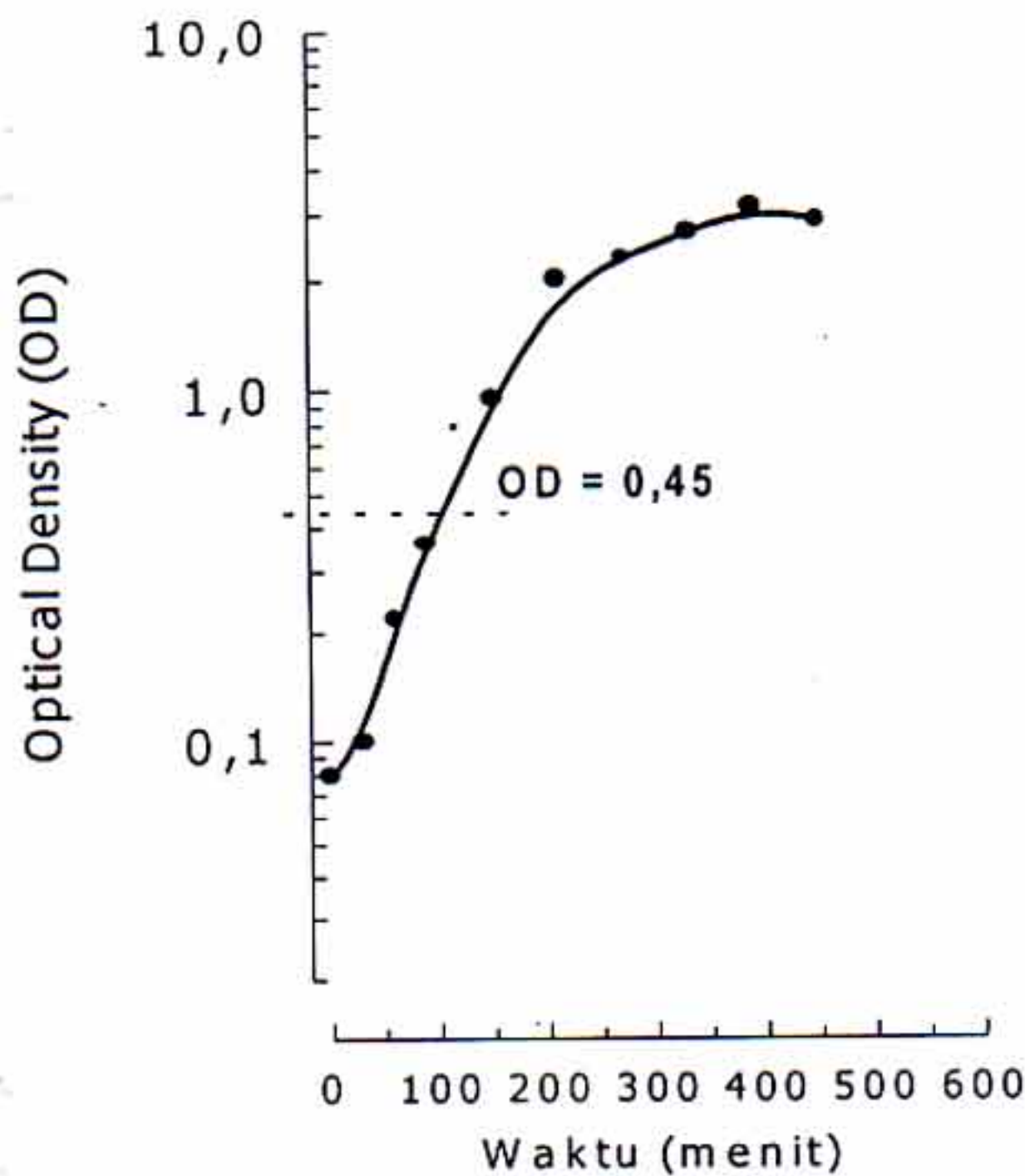
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* ditampilkan pada Gambar 1. Sebagaimana diketahui bahwa dalam masa pertumbuhannya bakteri mengalami empat fase, yaitu fase lag (penyesuaian), fase log (logaritmik atau

eksponensial), fase stasioner (seimbang) dan fase kematian (kemunduran atau penurunan) [15]. Saat fase lag, bakteri menjalani adaptasi dalam medium baru dan tumbuh sebagai penyesuaian diri dengan lingkungannya yang baru. Pada fase pertama ini, tidak ada penambahan populasi bakteri karena hanya terjadi penambahan substansi intraselular, 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 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 nutrien 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 menjadikan grafik pertumbuhan menurun kembali. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan sampai fase kematian, karena sebagai bahan vaksin yang akan dibuat untuk vaksin aktif berasal dari bakteri hidup.

Pertumbuhan isolat bakteri *S. agalactiae* dalam medium cair BHI sebagaimana terlihat pada Gambar 1, ternyata tidak memasuki fase lag tetapi langsung ke fase log. Hal ini terjadi karena bakteri mampu beradaptasi secara baik terhadap lingkungannya dengan langsung memanfaatkan bahan-bahan dalam medium untuk pertumbuhannya dan sebelumnya isolat bakteri telah ditumbuhkan dalam medium BHI agar dan cair. Pertumbuhan bakteri yang optimum untuk mencapai puncak fase log-nya dicapai setelah inkubasi selama 210 menit (3,5 jam) dengan nilai OD= 2,00, selanjutnya bakteri memasuki fase stasioner, sedangkan nilai OD pada pertengahan fase log-nya

yaitu 0,45 dicapai setelah inkubasi selama 1,5 jam. Bakteri yang tumbuh dan telah mencapai nilai tengah OD fase log ini digunakan sebagai bahan vaksin untuk diiradiasi, karena pada saat ini sel bakteri masih aktif membelah diri dalam masa pertumbuhannya. Adapun hasil penghitungan koloni bakteri untuk penentuan LD50-nya disajikan pada Tabel 1.



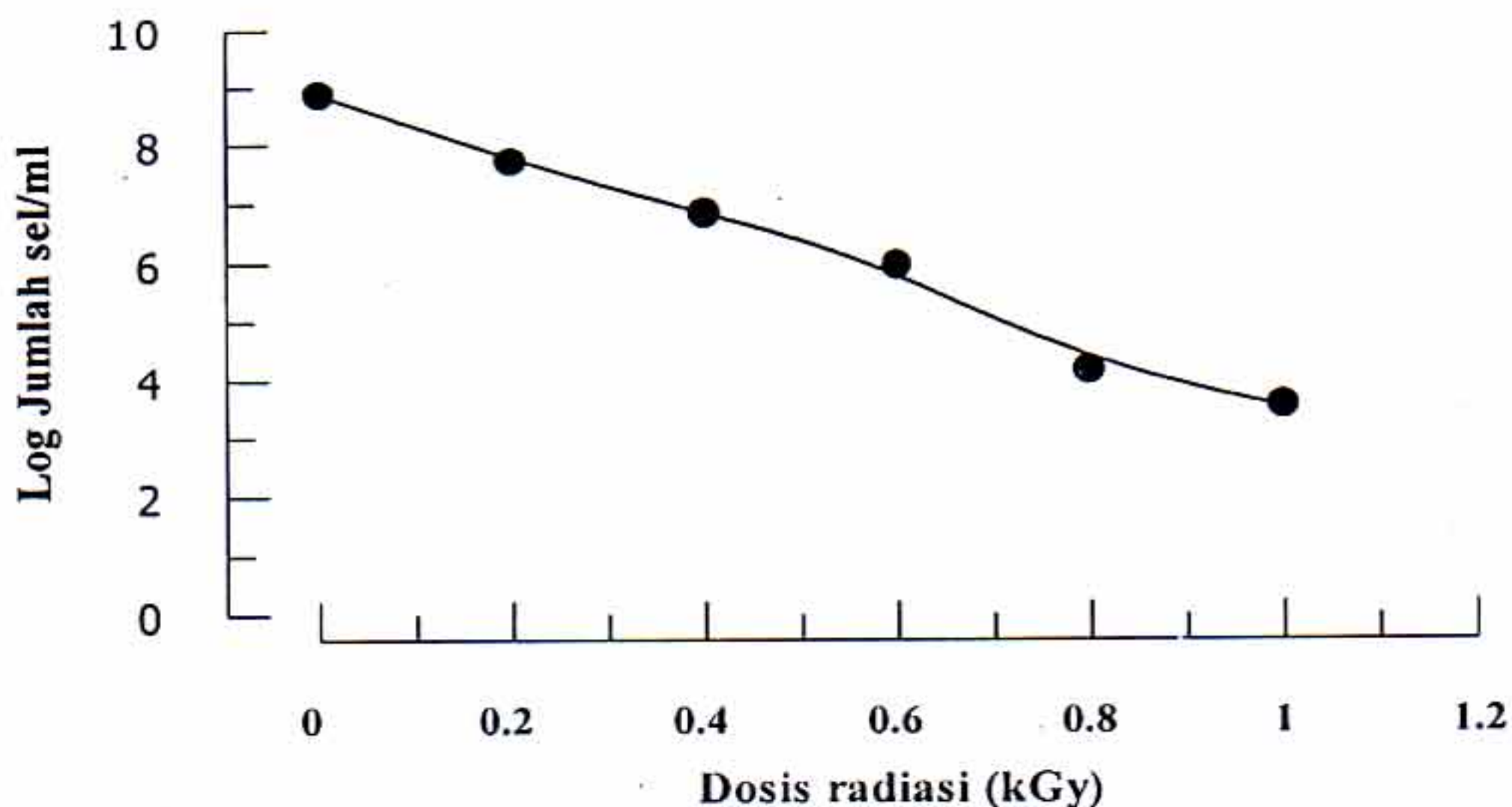
Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri penyebab mastitis, *S. agalactiae* serta nilai tengah densitas optik (OD 0,5) pada fase log pertumbuhannya.

Dari hasil penghitungan koloni pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa jumlah bakteri pada LD₅₀ sebanyak $3,75 \cdot 10^8$ sel/mL. Jumlah bakteri tersebut diperoleh jika *S. agalactiae* diiradiasi dengan dosis antara 0 sampai 0,2 kGy.

Tabel 1. Hasil penghitungan jumlah koloni bakteri *S. agalactiae* setelah perlakuan iradiasi dengan dosis yang bervariasi (rata-rata dari 3 kali ulangan).

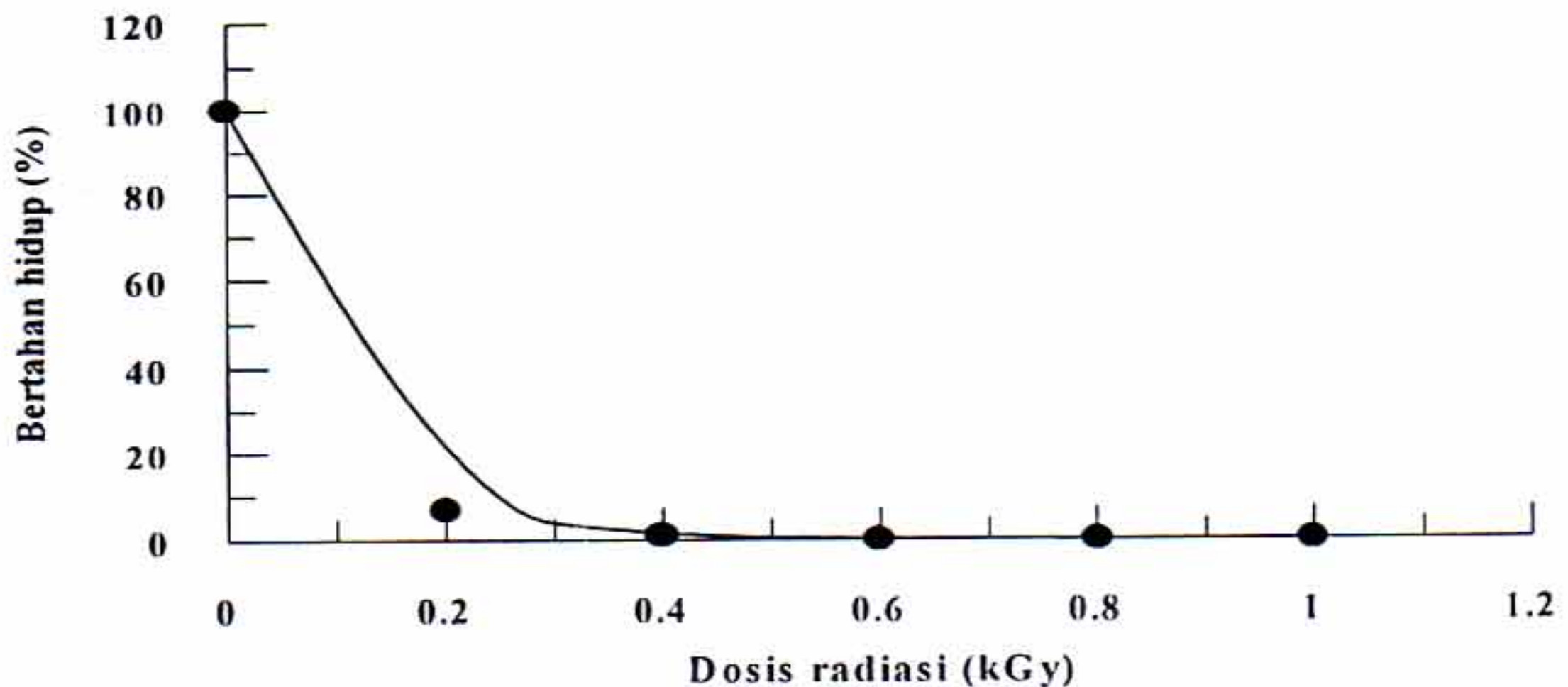
DOSIS IRADIASI	JUMLAH SEL / mL	KETERANGAN
0 kGy	$7,5 \times 10^8$	$LD_{50} = 7,5 \cdot 10^8 \times 50\% = 3,75 \cdot 10^8$
0,2 kGy	$5,0 \times 10^7$	
0,4 kGy	$7,0 \times 10^6$	
0,6 kGy	$9,5 \times 10^5$	
0,8 kGy	$1,5 \times 10^4$	
1,0 kGy	$3,5 \times 10^3$	

Pada Gambar 2 terlihat pengaruh iradiasi pada jumlah sel bakteri hidup. Semakin tinggi dosis iradiasi semakin rendah jumlah sel/mL yang masih bertahan hidup. Sebagaimana telah diketahui bahwa 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 [16]. Efek tak langsung dari iradiasi pada mikroba umumnya disebabkan oleh produk-produk radiolisis dari air yang berada di dalam dan di luar mikroorganisme. Radikal-radikal bebas yang dihasilkan akan bereaksi dengan molekul biologi yang penting seperti basa dan rantai DNA, asam amino dan protein [17]. Namun demikian, akibat radiasi pada bakteri *S. agalactiae* perlu dikaji lagi, terutama kemungkinan kerusakan pada *antigenic site* pada kromosom DNA-nya. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma dapat melemahkan bakteri *S. agalactiae*, tetapi kemampuannya untuk menimbulkan tanggap kebal pada ternak masih harus diteliti lebih lanjut.



Gambar 2. Pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* dari kasus mastitis.

Untuk pembuatan vaksin aktif yang berasal dari bakteri hidup, radiasi dapat dimanfaatkan untuk melemahkan bakteri sampai LD₅₀, yaitu kemampuan radiasi dalam menurunkan jumlah sel bakteri sebanyak 50% (*Lethal dose 50%*). Dengan kata lain, bakteri yang akan digunakan sebagai bahan vaksin adalah bakteri yang 50% masih bertahan hidup setelah diiradiasi sinar gamma dengan dosis tertentu. *Lethal dose 50%* sinar gamma terhadap bakteri *S. agalactiae* sebagaimana terlihat pada Gambar 3, masih di bawah 0,2 kGy.



Gambar 3. Persentasi bakteri *S. agalactiae* yang bertahan hidup (%) akibat perlakuan iradiasi sinar gamma.

KESIMPULAN

Iradiasi sinar gamma dapat melemahkan bakteri *S. agalactiae*, meskipun demikian kemampuannya untuk menimbulkan tanggap kebal pada ternak masih harus diteliti lebih lanjut. Semakin tinggi dosis iradiasi semakin rendah jumlah bakteri yang masih dapat bertahan hidup. LD₅₀ sinar gamma untuk bakteri *S. agalactiae* penyebab penyakit mastitis pada sapi perah masih dibawah 0,2 kGy, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan di bawah dosis iradiasi tersebut untuk mendapatkan bahan vaksin aktif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada kerabat kerja, Yusneti, Dinardi, dan Almaida yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terselenggara dengan baik.