

LD₅₀ SINAR GAMMA PADA *Streptococcus agalactiae* UNTUK BAHAN VAKSIN IRADIASI MASTITIS PADA SAPI PERAH

T. Handayani, B. J. Tuasikal, I. Sugoro
Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN

ABSTRAK

LD₅₀ SINAR GAMMA PADA *Streptococcus agalactiae* UNTUK BAHAN VAKSIN IRADIASI MASTITIS PADA SAPI PERAH. *Streptococcus agalactiae* merupakan salah satu penyebab utama mastitis pada sapi perah yang mengakibatkan turunnya produksi susu. Percobaan ini bertujuan untuk memperoleh dosis radiasi sinar gamma yang menyebabkan 50% kematian (LD₅₀) yang selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan vaksin mastitis. Tahapan percobaan terdiri dari pembuatan kurva tumbuh, kurva standar, dan penentuan LD₅₀. Pembuatan kurva tumbuh dan kurva standar bakteri menggunakan *Brain Heart Infusion (BHI) broth* dan *BHI agar* sebagai media tumbuh. Pertumbuhan diamati dengan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada λ_{660} . Kurva standar diperoleh dengan menghitung jumlah koloni bakteri pada *BHI agar plate*. Penentuan LD₅₀ dengan meradiasi bakteri menggunakan sinar gamma pada dosis 0; 25; 50; 75; dan 100 Gy. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kecepatan pembelahan maksimum (μ maks) terjadi pada jam ke-2,5 dan kurva standar diperoleh persamaan $y = 1,492x + 5,8225$ (y : log jumlah bakteri dan x : absorbansi). LD₅₀ *S. agalactiae* diperoleh pada dosis radiasi di bawah 25 Gy.

Kata Kunci : *Streptococcus agalactiae*, kurva standar, dan LD₅₀

ABSTRACT

LD₅₀ GAMMA RAY OF *Streptococcus agalactiae* AS MASTITIS VACCINE IRRADIATED IN DAIRY COW. *Streptococcus agalactiae* is a major mastitis agent that decreased the milk production. The experiment has been carried out to find the gamma radiation doses that caused 50% mortality (LD₅₀) on mastitis vaccine agent. The parameters observed were measurement of growth curve, standard curve and LD₅₀. Growth curve and standard curve used *Brain Heart Infusion (BHI) broth* and *BHI agar* as growth media. The growth of bacteria was measured by spectrophotometre λ_{660} . Standard curve was measured by total plate count in *BHI agar*. The doses of LD₅₀ were 0; 25; 50; 75 and 100 Gy. The results showed that the rate of maximum growth occurred in 2,5 h and the formula of standard curve was $y = 1,492x + 5,8225$ (y : log of bacteria number and x : absorbance). The dose of LD₅₀ was below of 25 Gy.

Key Words: *S. agalactiae*, standard curve, and LD₅₀

PENDAHULUAN

Subsektor peternakan telah dan akan terus berperan dalam pemantapan ketahanan pangan. Dengan laju pertumbuhan penduduk sebesar 1,45%, diperkirakan kebutuhan bahan pangan asal ternak semakin meningkat sekitar dua kali dari saat ini. Dalam hal ini inovasi teknologi veteriner, kesehatan hewan merupakan satu komponen yang penting. Penyakit pada hewan memiliki dampak sosial ekonomi yang luas, maka diperlukan teknologi biologi molekuler, teknologi diagnostik yang cepat dan akurat serta tersedianya vaksin yang mudah diaplikasikan (1).

Salah satu penyakit yang menjadi penyebab rendahnya produktivitas sapi perah di Indonesia adalah penyakit mastitis. Mastitis adalah penyakit dengan gejala peradangan pada kelenjar air susu (ambing) yang dapat mengakibatkan penurunan produksi air susu. Tingkat keparahan dan intensitas mastitis sangat dipengaruhi oleh organisme penyebabnya. Beberapa organisme penyebab mastitis adalah *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* dan *Staphylococcus aureus* (2,3).

Menurut Searcy *et. al.*, mastitis subklinis merupakan problema di peternakan sapi perah karena menyebabkan terjadi kerugian ekonomi yang cukup besar seperti adanya penurunan produksi susu, memerlukan biaya pengobatan bagi sapi sakit, dan sapi yang berulang terkena mastitis harus dikeluarkan dari peternakan lebih dini (*culling*). Selama ini pengobatan hanya dilakukan pada sapi yang secara klinis menunjukkan gejala sakit dengan pemberian antibiotik dalam jangka waktu lama. Pengobatan dengan antibiotik tersebut diketahui banyak menimbulkan efek samping, diantaranya akumulasi residu antibiotik dalam produk hewan yang dapat merugikan masyarakat konsumen (4,5). Kandungan residu obat yang melebihi batas maksimum menyebabkan daging dan susu tidak aman dikonsumsi karena timbul reaksi alergi, keracunan, resistensi mikroba tertentu atau mengakibatkan gangguan fisiologis pada manusia (6,7).

Dengan demikian perlu dilakukan penelitian mengenai upaya pencegahan mastitis tanpa penggunaan antibiotika. Misalnya pemanfaatan *S. agalactiae* sebagai kandidat

vaksin dengan teknik radiasi yang dapat menurunkan infektivitas, virulensi dan patogenitas agen penyakit tetapi diharapkan mampu merangsang timbulnya kekebalan pada tubuh terhadap infeksi penyakit (8). Selanjutnya, penggunaan obat-obatan seperti antibiotika yang diketahui mempunyai berbagai macam efek samping pada ternak maupun pada masyarakat konsumen dapat dikurangi atau bahkan ditiadakan.

Terkait dengan hal tersebut di atas dan sebagai tindak lanjut dari percobaan sebelumnya, maka percobaan ini dilakukan untuk memperoleh dosis radiasi yang menyebabkan kematian 50% (LD_{50}). Selanjutnya bakteri *S. agalactiae* tersebut dapat digunakan sebagai bahan vaksin mastitis pada sapi dengan teknik radiasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan peralatan

Isolat bakteri *Streptococcus agalactiae* yang digunakan dalam percobaan ini berasal dari kasus mastitis di Kecamatan Cilawu, Kabupaten Garut. Medium untuk pertumbuhan *S. agalactiae* yaitu *Brain Heart Infusion (BHI) agar*, dan *BHI broth* (Oxoid TM). Iradiasi kultur bakteri menggunakan irradiator gamma chamber di PATIR - BATAN.

Pembuatan Kurva Tumbuh

Kultur bakteri dipermuda dengan cara mengambil satu öse isolat *S. agalactiae* ke dalam medium *BHI agar* miring, selanjutnya disimpan di inkubator pada suhu 37°C selama semalam. Kultur yang tumbuh diambil lima öse untuk diinokulasikan ke dalam medium *BHI broth* 50 ml dan diinkubasi pada inkubator *shaker* dengan suhu 39°C pada agitasi 120 rpm. Selanjutnya diukur absorbansinya pada 0; 0,5; 1;; 4 jam menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi model 100 - 50 pada panjang gelombang 660 nm.

Kurva Standar

Inokulum pada *BHI agar* miring yang telah dipermuda diinokulasikan sebanyak lima öse kedalam Erlenmeyer yang berisi *BHI broth* 50 ml, kemudian diinkubasi ke dalam inkubator *shaker* pada suhu 39°C dan agitasi 120 rpm. Sebanyak enam tabung reaksi diisi masing-masing dengan inokulan dan *BHI broth* steril dengan perbandingan antara Inokulan : *BHI broth* adalah 0:3; 0,5:2,5; 1:2; 1,5:1,5; 2:1; dan 2,5:0,5. Kemudian masing-masing diukur absorbansinya dan dari masing-masing tabung reaksi diambil sebanyak 0,1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang telah diisi dengan 0,9 ml

NaCl 0,85% dan dilakukan pengenceran berseri dari 10^{-1} sampai 10^{-12} . Selanjutnya pada pengenceran 10^{-5} sampai dengan 10^{-12} diambil sebanyak 0,1 ml untuk ditanam pada media *BHI agar plate*. Seluruh *plate* disimpan dalam inkubator selama satu malam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh dihitung dan dibuat kurva standar dengan $y = \log$ jumlah sel/ml dan $x =$ absorbansi (9).

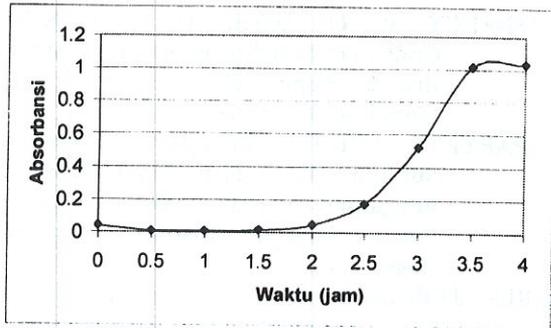
Penentuan Lethal Dose (LD_{50}) Sinar Gamma

Isolat bakteri *S. agalactiae* yang berumur satu hari diambil sebanyak lima öse dan dimasukkan kedalam erlenmeyer yang berisi *BHI broth* 50 ml, kemudian inokulum di agitasi 120 rpm, pada suhu 39°C. Inokulum diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dan hasil pengukuran absorbansi tersebut kemudian dimasukkan ke persamaan garis kurva standar untuk mengetahui jumlah volume yang ditambahkan dalam 50 ml inokulum agar diperoleh jumlah sel 10^8 sel/ml.

Dari kultur 50 ml dengan jumlah sel bakteri 10^8 sel/ml, diambil 30 ml sebagai inokulum dan dimasukkan ke tabung sentrifuge. Tabung disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm, pada 4°C selama 10 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal dicuci dengan NaCl, sentrifuge diulang sebanyak 3 kali. Pelet dilarutkan dengan NaCl sebanyak 30 ml (jumlah sel bakteri 10^8 sel/ml), kemudian dimasukkan ke dalam 5 tabung masing-masing sebanyak 5 ml. Bakteri diradiasi dengan menggunakan sinar gamma masing-masing pada dosis yaitu 0 Gy; 25 Gy; 50 Gy; 75 Gy; dan 100 Gy. Setelah itu bakteri ditanam pada *BHI agar plate* dari pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-12} dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung untuk penentuan LD_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *S. agalactiae* mengalami 3 fase yaitu fase adaptasi (lag), fase eksponensial (log), dan fase stasioner (Gambar 1). Fase adaptasi merupakan masa penyesuaian bagi bakteri dan tidak terjadi pertambahan jumlah sel dan terjadi hingga jam ke-1,5. Fase eksponensial terjadi hingga jam ke-3,5. Fase ini merupakan fase pertumbuhan yang memiliki laju pertumbuhan spesifik, yaitu laju pembelahan sel yang tetap (10). Selanjutnya fase stasioner yaitu saat jumlah sel mencapai maksimal, laju pembiakan berkurang dan beberapa sel mati yang ditunjukkan oleh menyusutnya nutrisi dalam media. Fase stasioner terjadi pada jam ke 3,5 - 4 jam.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* pada *BHI broth* dengan suhu inkubasi 39°C dan agitasi 120 rpm

Kecepatan pembelahan sel bakteri *S. agalactiae* dapat diperoleh dengan mengukur absorbansi sel tiap jam sehingga akan diperoleh pembelahan sel bakteri tiap jam. Penghitungan kecepatan pembelahan sel menggunakan rumus $\mu = (\ln x_t - \ln x_{t_0}) / (t - t_0)$. Kecepatan pembelahan maksimum (μ maks) terjadi pada jam ke-2,5. Waktu 2,5 jam tersebut digunakan sebagai umur kultur yang akan diiradiasi. μ maks adalah waktu di mana sel melakukan aktivitas metabolisme yang tinggi dan memiliki membran sel yang tipis. Efek iradiasi lebih optimal bila umur kultur yang diiradiasi tepat pada saat μ maks (11).

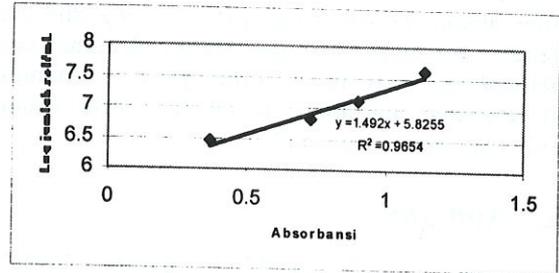
Tabel 1. Kecepatan Pembelahan *S. agalactiae*, berdasarkan absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm

Waktu (jam)	Absorbansi	μ (sel/jam)
0	0.04	0
0.5	0.01	-2.77259
1.0	0.01	0
1.5	0.02	1.386294
2.0	0.05	1.832581
2.5	0.18	2.561868
3.0	0.52	2.121744
3.5	1.02	1.347458
4.0	1.03	0.019512

Keterangan: μ = kecepatan pembelahan sel/jam

Berdasarkan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada *agar plate* diperoleh kurva standar bakteri *S. agalactiae* mengikuti persamaan $y = 1,492x + 5,8225$ (Gambar 2). Persamaan tersebut akan digunakan untuk menghitung secara tidak langsung dari kultur bakteri yang akan diiradiasi. Keuntungan dari pembuatan kurva standar adalah untuk mendapatkan kemudahan penelitian,

penghematan media dan waktunya relatif singkat (9). Sebagai contoh apabila kultur *S. agalactiae* yang berumur 2,5 jam memiliki nilai absorbansi 1, maka jumlah sel berdasarkan persamaan kurva standar di atas adalah $10^{7.3154}$.

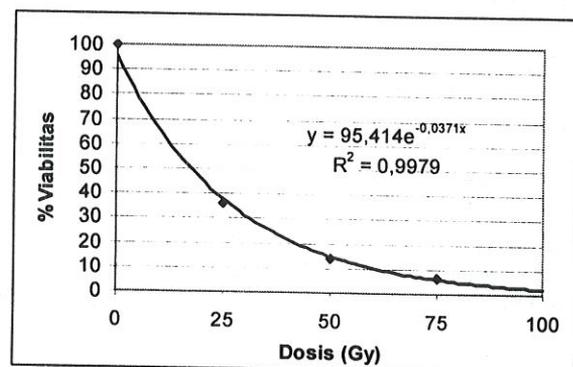


Gambar 2. Kurva standar pertumbuhan *S. agalactiae* dalam medium *BHI broth*

Hasil iradiasi kultur bakteri menunjukkan bahwa dosis radiasi yang digunakan belum mendapatkan nilai dosis untuk LD₅₀ (Tabel 2 dan Gambar 3). Dosis LD₅₀ masih di bawah 25 Gy sehingga diperlukan percobaan lebih lanjut. LD₅₀ adalah dosis iradiasi yang mampu menyebabkan kematian sel hingga 50 % dari total populasi. Dengan kata lain, bakteri yang akan digunakan sebagai bahan vaksin adalah bakteri yang 50% bertahan hidup setelah perlakuan pada dosis radiasi tertentu.

Tabel 2. Hasil penghitungan jumlah koloni *S. agalactiae* setelah diradiasi dengan berbagai dosis radiasi gamma

Dosis (Gy)	Jumlah sel/ml	% Viabilitas
0	1,69x10 ⁹	100
25	6,10x10 ⁸	36,1
50	2,40x10 ⁸	14,2
75	1,05x10 ⁸	6,21
100		



Gambar 3. Viabilitas sel bakteri *S. agalactiae* setelah diradiasi dengan berbagai dosis radiasi gamma

Sel bakteri yang terkena sinar gamma akan menyebabkan terjadinya kematian sel, sel tetap hidup normal, sel tetap hidup tetapi mengalami mutasi, atau sel akan mati setelah beberapa generasi (apoptosis) (11). Dalam percobaan ini diharapkan sel bakteri *S. agalactiae* akan dapat dilemahkan dengan sinar gamma yang ditandai dengan menurunnya infektivitas, virulensi dan patogenitas tetapi diharapkan mampu merangsang timbulnya kekebalan pada tubuh terhadap infeksi penyakit.

KESIMPULAN

LD₅₀ sinar gamma pada bakteri *Streptococcus agalactiae* berada pada dosis dibawah 25 Gy, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memperoleh dosis yang tepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Bpk Dinardi dan Ibu Yusneti atas kerjasamanya yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. ANONIMUS. Seminar Nasional: Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. 2006. Hal. viii-ix.
2. DUVAL, J. Treating mastitis without antibiotics. Ecological Agriculture Projects. <http://www.eap.mcgill.ca/Publications/EAP69.htm>. 1997. [15-12-2000].
3. SUBRANTO. Ilmu Penyakit Ternak I. Gadjah Mada University Press. 1989. Hal. 328-329.
4. SEARCY, R., O. REYES, G. GUAJARDO. Control of Subclinical bovine mastitis. British Homeopathic Journal. April 1995. Vol. 84 : 67-70.
5. PARYATI, S.P.Y., Patogenesis Mastitis Subklinis Pada Sapi Perah. Makalah Pengantar Falsafah Sains Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. 2002
6. RESURRECCION, A.V.A. and F.C.F. GALVES. Will Consumers Buy Irradiated beef? Food Techno. 1999.53:52-55
7. KHODIJAH, S., TUASIKAL, B.J., SUGORO, I., dan YUSNETI. Pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* Sebagai bakteri penyebab Mastitis Subklinis Pada Sapi Perah. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. (Belum diterbitkan)
8. SUGORO, I. Peranan Teknik Nuklir di Bidang Peternakan. 22 Mei 2004. Kompas No. 20 (4)
9. YUSNETI, dan DINARDI, Kurva Standar Isolat Bakteri *Streptococcus agalactiae*. BATAN.2005. Makalah unpublsh
10. MANGUNWIDJAJA, D., dan SURYANI, A., Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya. 1994. Hal. 15-17.
11. SUGORO, I., Modul Kuliah : Radiobiologi Dasar. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. (2005)