

Dekontaminasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada Feses Menggunakan Beberapa Jenis Desinfektan

Decontamination of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Faeces Using Different Disinfectants

Ika Suharti^{1*}, Ni Luh Putu Ika Mayasari², Fachriyan Hasmi Pasaribu²,

¹Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian, Jl Raya Kampung Utan, Setu, Cikarang Barat, Bekasi, 17520;

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor, 16680

*Email : ikaebuttmkp.org

Naskah diterima : 26 Juli 2017, direvisi : 20 September 2017, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Paratuberculosis or *Johne's Disease* is a granulomatous enteritis chronic disease of domestic and wild ruminants caused by infection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. The disease commonly infects dairy cattle with clinical signs of chronic diarrhea, decreasing body weight, low milk production, oedema, anemia and occasionally infertility. The basic procedure in order to control Paratuberculosis in farms is to do a good and proper handling of animal faecal. Disinfection of animal environments such as pens, faecal, sewerage and sewage are important in prevention of transmission of this disease. The purpose of this research was to determine specific disinfectant and dosage for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* decontamination in cattle feces so it can be applied as disease control measures. Cow's feces were contaminated with MAP 10^5 CFU/ml and treated with ammonium quartener, phenolic and formaldehyde disinfectant it doses 10%, 15% and 20% each. The effectiveness of the disinfectant was tested based on MAP identification using Löwenstein-Jensen culture medium and *nested Polymer Chain Reaction* (PCR). The results showed 15% and 20% doses of formaldehyde disinfectants effective to decontaminate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle feces.

Keywords: Disinfectant, feces, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Abstrak

Paratuberkulosis atau *Johne's Diseases* merupakan penyakit infeksius yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) terutama dapat menyerang hewan ruminansia baik domestik maupun liar yang berdampak pada kerugian ekonomi. Secara umum penyakit ini dapat dikendalikan tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama dan memerlukan biaya yang tinggi, sehingga pencegahan penularan adalah cara yang paling efektif dalam pengendalian penyakit ini. Prosedur dasar yang perlu dilakukan untuk mengendalikan penyakit Paratuberkulosis di peternakan adalah dengan melakukan penanganan yang baik dan benar terhadap kotoran sapi. Desinfeksi terhadap lingkungan hewan seperti kandang, feses dan saluran pembuangan air dan kotoran penting dilakukan dalam pencegahan penularan penyakit ini terutama di kandang terjangkit penyakit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan metode perlakuan desinfeksi tertentu pada feses sapi yang terkontaminasi MAP sehingga dapat diaplikasikan sebagai tindakan pengendalian penyakit. Feses sapi dikontaminasi dengan MAP 10^5 CFU/ml dan diberi perlakuan desinfeksi dengan menggunakan desinfektan amonium quartener, fenolik dan formaldehid masing-masing dengan dosis 10%, 15% dan 20%. Efektifitas dari desinfektan diuji berdasarkan identifikasi MAP dengan menggunakan media kultur *Löwenstein jensen* dan uji PCR. Hasil uji menunjukkan bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* pada feses dapat didekontaminasi dengan desinfektan formaldehid dosis 15% dan 20%.

Kata kunci : desinfektan, feses, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Pendahuluan

Paratuberkulosis merupakan salah satu penyakit yang penting dalam peternakan sapi karena dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan seperti terjadi penurunan produksi susu, gangguan reproduksi, peningkatan *calving interval*, pengafkiran dini, penurunan kualitas dan kuantitas daging (Greig *et al.* 1999; Hasanova dan Pavlik, 2006). Secara umum penyakit ini dapat dikendalikan tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama dan memerlukan biaya yang tinggi, sehingga pencegahan penularan adalah cara yang paling efektif dalam pengendalian penyakit ini. Prosedur dasar yang perlu dilakukan untuk mengendalikan penyakit Paratuberkulosis di peternakan adalah dengan melakukan penanganan yang baik dan benar terhadap kotoran sapi. Hal ini sangat penting karena feses merupakan media penularan utama dalam penyakit ini. Desinfeksi terhadap lingkungan hewan seperti kandang, feses dan saluran pembuangan air dan kotoran penting dilakukan dalam pencegahan penularan penyakit ini terutama dikandang terjangkit penyakit.

Paratuberkulosis atau *Johne's Diseases* (JD) dilaporkan terjadi di semua belahan dunia di benua Amerika, Eropa, Afrika, Asia dan Australia. Di Indonesia, secara tertulis penyakit ini termasuk dalam penyakit eksotik atau dikategorikan tidak ada di Indonesia. Namun penemuan kejadian penyakit ini dilaporkan oleh beberapa balai penelitian di Indonesia seperti Lembaga Pusat Penyakit Hewan (LPPH) pada tahun 1958 di Bogor, Balai Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) tahun 1985 di Medan (Setyowati *et al.* 1986), Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet) pada tahun 2004 di Jawa Barat dan 2008 di Jawa Barat dan Jawa Tengah (Adji 2004, 2008). Setelah ditemukannya sapi impor dari Australia yang terinfeksi Paratuberkulosis pada akhir tahun 2010 di Cilacap, pemerintah memutuskan melalui Peraturan Menteri Pertanian mengubah status penyakit

Paratuberkulosis menjadi non eksotik atau ada di Indonesia. Adanya kasus tersebut menunjukkan bahwa pengawasan importasi sapi potong dan sapi bibit perlu ditingkatkan sebagai salah satu cara pencegahan penyebaran Paratuberkulosis di Indonesia, terutama dari Australia dan New Zealand karena kedua negara tersebut merupakan negara endemis Paratuberkulosis. Salah satu tindakan yang bisa dilakukan adalah dengan melakukan desinfeksi terhadap feses dari sapi impor tersebut. Desinfeksi bertujuan untuk mendekontaminasi kemungkinan keberadaan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) pada feses sapi. Penentuan desinfektan serta dosis yang efektif dalam mendekontaminasi MAP sangat diperlukan. Informasi ini penting dalam rangka untuk pengendalian penyakit dan mencegah penularan penyakit. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan jenis dan dosis desinfektan yang efektif untuk dekontaminasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada feses sapi yang selanjutnya dapat digunakan dalam tindakan perlakuan di lapangan.

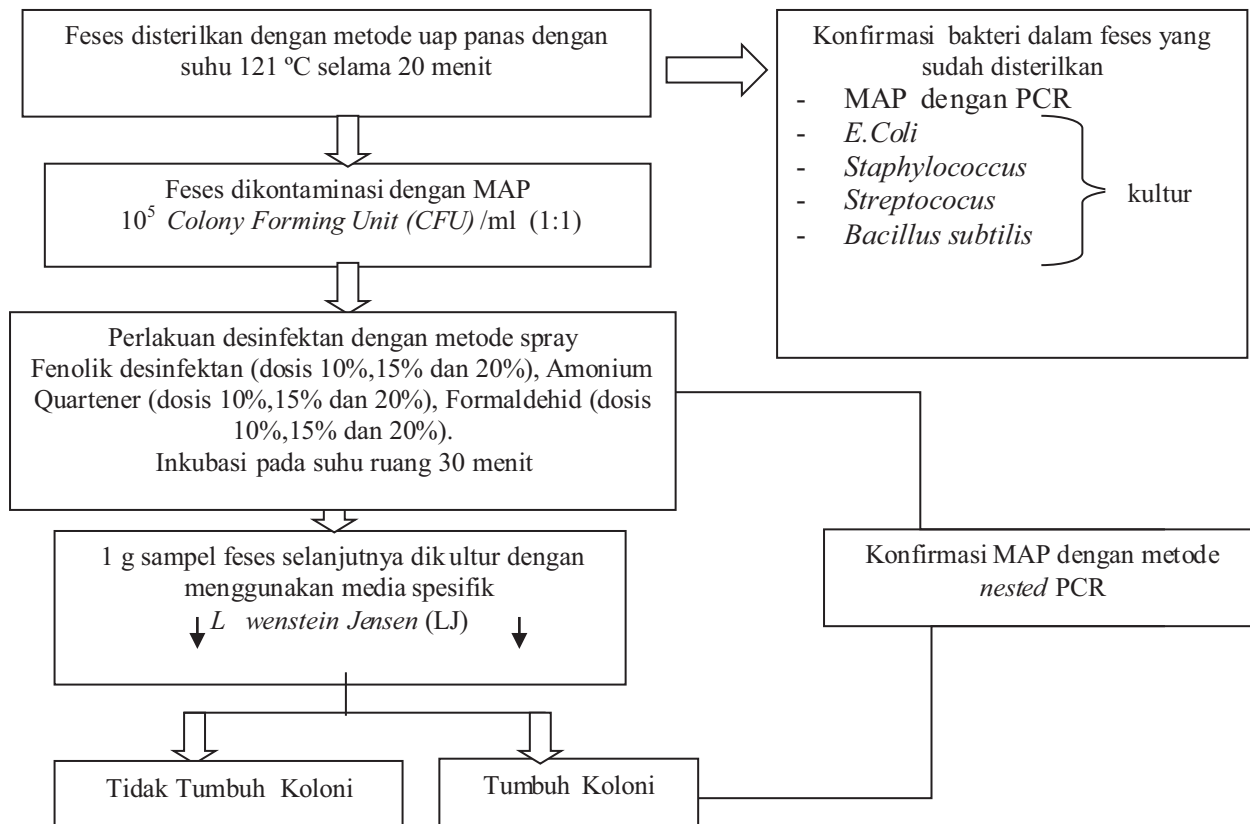
Materi dan Metode

Sterilisasi feses yang digunakan

Feses diambil secara perrektal dari sapi yang berasal dari peternakan sapi lokal di Bekasi. Feses dalam bentuk bolus ditempatkan dalam wadah terbuka, selanjutnya disterilkan dengan uap panas suhu 121 °C selama 20 menit. Pengujian konfirmasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) pada feses dilakukan dengan metode kultur dan *nested Polymerase Chain Reaction* (PCR). Konfirmasi bakteri pencemar lain seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan *Bacillus subtilis* juga dilakukan dengan metode kultur.

Kontaminasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada Feses

Kerangka Konsep Penelitian



Feses sapi steril dikontaminasi dengan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* konsentrasi 10^5 CFU/ml dengan cara dicampur langsung dengan perbandingan 50 g feses ditambahkan dengan 50 ml bakteri MAP (10^5 CFU/ml) kemudian dihomogenkan.

Perlakuan Desinfeksi pada Feses

Sampel feses sapi yang telah dikontaminasi ditempatkan dalam 9 cawan petri dan didesinfeksi dengan desinfektan fenolik, amonium quartener dan formaldehid dengan dosis masing-masing 10%, 15% dan 20% sesuai dengan kelompok perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan metode *spraying*, dihomogenkan, dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit.

Isolasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Metode kultur yang digunakan sesuai dengan standar OIE (2012). Sebanyak 1 g feses yang telah ditambahkan MAP dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml dan didesinfeksi dimasukkan ke dalam tabung ukuran 50 ml dan ditambahkan ddH₂O sebanyak 20 ml, kemudian dihomogenkan dengan vortek, selanjutnya digoyang selama 30 menit dengan *horizontal shaker* dan dидiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan paling atas diambil 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung baru yang berisi 25 ml *hexadecyl pyridinium chloride* (HPC) 0.9%, kemudian dihomogenkan dengan vortek dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 18 jam. Tabung tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dengan 1 ml *amphotericin B* (50 µg/ml) dan diinokulasikan 0.2 ml pada media *Löwenstein-Jensen*. Tabung media diinkubasi pada 37 °C selama 1 minggu dalam posisi miring/*slant* dengan tutup dilonggarkan.

Setelah 1 minggu kultur ditegakkan dan tutup dirapatkan kemudian dilanjutkan dengan pengamatan pertumbuhan kultur pada media setiap minggu sampai dengan minggu ke-24.

Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dengan *Nested Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Ekstraksi DNA *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dari feses

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *QIAmp stool mini kit* (Qiagen Kit, Germany). Sampel feses sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam tabung 15 ml steril dan ditambahkan *buffer* ASL sebanyak 10 ml, kemudian dihomogenkan selama 1 menit. *Lysate* diambil sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml, kemudian dilakukan pemanasan dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 5 menit, larutan dihomogenkan selama 15 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan diambil sebanyak 1.2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan 1 tablet *InhibitEX* dan dihomogenkan sampai tablet terlarut, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro, selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Sebanyak 200 µl supernatan ditambahkan dengan 15 µl *Proteinase K* (10 mg/ml) dan 200 µl *buffer* AL yang selanjutnya dihomogenkan selama 15 detik serta diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70 °C. *Lysate* ditambah dengan 200 µl etanol 96% dan dihomogenkan. Larutan tersebut diambil 500 µl dan dimasukkan ke dalam *QIAmp spin column* yang dilengkapi dengan tabung koleksi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan tabung koleksi yang mengandung

filtrat dibuang. *QIAmp spin column* dipasang dengan tabung koleksi baru, dan ditambahkan *buffer* AW1 sebanyak 500 µl. Disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit dan tabung koleksi dibuang. *QIAmp spin column* dipasang dengan tabung koleksi baru, ditambahkan *buffer* AW2 sebanyak 500 µl disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit dan tabung koleksi dibuang. *QIAmp spin column* tersebut dipasangkan dengan tabung mikro. *Buffer* AE sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam *column*, diinkubasi selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit dan tabung mikro yang mengandung filtrat diambil, kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

Ekstraksi DNA *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dari kultur (isolat)

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *DNeasy® Blood and Tissue Kit* (Qiagen Kit, Germany). Isolat bakteri yang tumbuh pada media LJ diambil menggunakan ose dan dilarutkan ke dalam 1 ml PBS 0.5% dalam tabung mikro 1.5 ml selanjutnya dihomogenkan menggunakan vortek. Semua sediaan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan kembali dengan larutan penyangga TE 180 µl untuk selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Suspensi dipanaskan dengan penangas air pada suhu 100 °C 10 menit dan dilanjutkan dengan menambahkan 30 µl proteinase K (10 mg/ml) dan 200 µl *buffer* AL dihomogenkan perlahan dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 2 jam. *Buffer* AL 200 µL dan 200 µL etanol 96% ditambahkan dan disentrifugasi selama 10 detik. Semua larutan dalam tabung dipindahkan ke dalam *DNeasy Mini Spin Column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Larutan dalam tabung koleksi dibuang, *DNeasy Mini Spin Column* dimasukkan kembali pada tabung koleksi baru dan ditambahkan

500 μ L *buffer* AW, kemudian disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 8000 rpm. Larutan dalam tabung koleksi dibuang, *DNeasy Mini Spin Column* dimasukkan kembali pada tabung koleksi kemudian ditambahkan 500 μ L *buffer* AW2 dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Larutan pada tabung koleksi dibuang dan *DNeasy Mini Spin Column* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. *DNeasy Mini Spin Column* ditempatkan pada tabung mikro 1.5 ml kemudian ditambahkan *buffer* AE 100 μ L, diinkubasi selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Ekstrak DNA kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20 °C.

Amplifikasi DNA menggunakan primers F57

Amplifikasi DNA dilakukan dengan *nested* PCR dengan menggunakan *KAPA Taq PCR kit* dengan primer spesifik F57. Amplifikasi menggunakan primer *forward* (F57) 5'-CCT GTC TAA TTC GAT CAC GGA CTA GA-3' dan *reverse* (R57) 5'-TCA GCT ATT GGT GTA CCG AAT GT-3' dengan panjang amplifikasi 432 bp dan amplifikasi kedua (*nested*) menggunakan *forward* (F57Rn) 5'-TGG TGT ACC GAA TGT TGT TGT CAC-3' dan primer *reverse* R57 dengan panjang amplifikasi 424 bp (Vansnik *et al.* 2004). Kedua amplifikasi PCR dilakukan dengan masing-masing total volume 20 μ l larutan reaksi yang terdiri dari 12.7 μ l dd H₂O (DNase, RNase free), 4 μ l 5 \times 2G fast PCR *buffer*, 0.4 μ l dNTP (10 mM), 0.1 μ l *Taq Polymerase* (250 U), 0.4 μ l *primers* F57F (10 μ M) dan 0.4 μ l *primers* F57R (10 μ M) untuk amplifikasi pertama, dan 0.4 μ l *primers* F57R (10 μ M) dan 0.4 μ l *primers* F57Rn (10 μ M) untuk amplifikasi kedua serta 2 μ l DNA *template*. Amplifikasi pertama dan kedua dilakukan dengan siklus PCR yang sama, yaitu dengan urutan 1 siklus pada 95 °C selama 3 menit, 35 siklus pada 95 °C selama 15 detik, 61 °C selama 15 detik dan 72 °C selama 15 detik dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada

72 °C selama 5 menit dengan menggunakan mesin PCR.

Hasil PCR dicampur dengan 1.5 μ l larutan *blue loading dye* 6 \times (MBI Fermentas) dan divisualisasi dalam 1.5% *gel agarose* (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany) yang telah ditambahkan *ethidium bromide* (Applichem) 0.5 μ g/ml pada tegangan 130 volt dalam larutan penyangga 1 \times TAE (0.04 mol/l Tris; 0.001 mol/l EDTA; pH 7.8) selama 30 menit. Hasil elektroforesis selanjutnya dilihat dengan menggunakan *gel documentation system*.

Analisa Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Konfirmasi Beberapa Jenis Bakteri pada Feses yang Digunakan

Bakteri yang diidentifikasi pada feses yang digunakan antara lain *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis* dan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Tabel 1 menampilkan hasil identifikasi bakteri dalam feses yang digunakan, yang dibedakan dalam feses sebelum sterilisasi, feses setelah sterilisasi dan feses steril setelah kontaminasi dengan MAP.

Selain konfirmasi dengan menggunakan uji biokimia, amplifikasi DNA MAP juga dilakukan terhadap sampel feses sebelum sterilisasi, feses setelah sterilisasi dan feses steril setelah kontaminasi. Gambar 1 menampilkan hasil identifikasi molekuler MAP pada feses menunjukkan adanya pita amplicon pada kelompok sampel feses yang dikontaminasi MAP tetapi tidak terdapat pita amplicon pada feses sebelum dan setelah sterilisasi. Hasil tersebut sesuai dengan hasil identifikasi melalui media kultur.

Tabel. 1 Hasil identifikasi bakteri MAP, *E.Coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan *Bacilus Subtilis* pada feses dengan media kultur

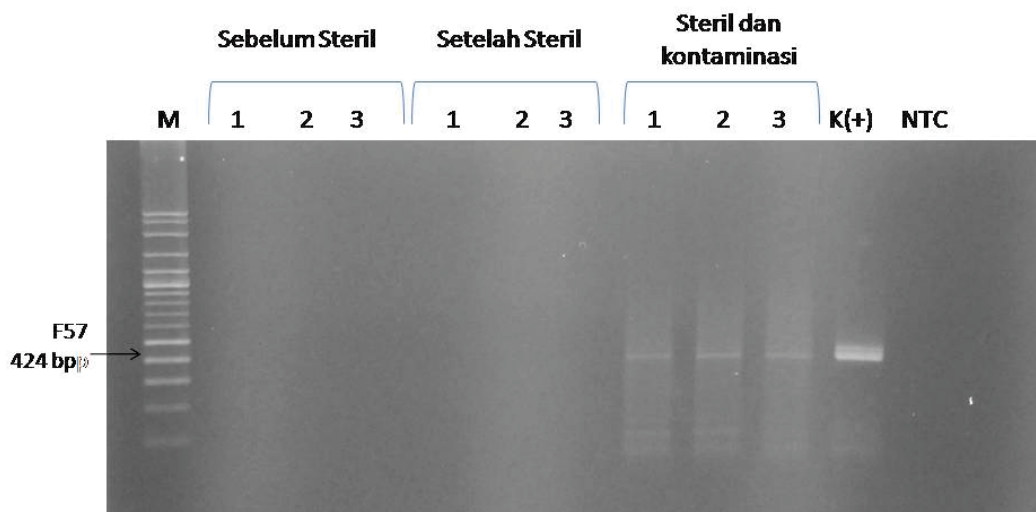
Sampel		Hasil Identifikasi Bakteri				
		MAP	<i>E. Coli</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacilus Subtillis</i>
Feses sebelum Sterilisasi	1	-	+	+	-	-
	2	-	+	+	-	-
	3	-	+	+	-	-
Feses setelah sterilisasi	1	-	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	-
	3	-	-	+	-	-
Feses steril setelah kontaminasi	1	+	-	+	-	-
	2	+	-	+	-	-
	3	+	-	+	-	-

+ : terdapat bakteri pada feses ; - : tidak terdapat bakteri dalam feses

Kultur media dan uji biokimia pada identifikasi bakteri dalam feses menunjukkan bakteri *Staphylococcus* merupakan bakteri yang ditemukan pada semua sampel feses. Bakteri *Streptococcus* dan *Bacillus subtilis* tidak ditemukan pada semua sampel dan *Escherichia coli* hanya ditemukan pada sampel feses sebelum sterilisasi. MAP tidak ditemukan pada feses sebelum sterilisasi dan setelah sterilisasi.

Selain konfirmasi dengan menggunakan uji

biokimia, amplifikasi DNA MAP juga dilakukan terhadap sampel feses sebelum sterilisasi, feses setelah sterilisasi dan feses steril setelah kontaminasi. Gambar 1 menampilkan hasil identifikasi molekuler MAP pada feses menunjukkan adanya pita amplicon pada kelompok sampel feses yang dikontaminasi MAP tetapi tidak terdapat pita amplicon pada feses sebelum dan setelah sterilisasi. Hasil tersebut sesuai dengan hasil identifikasi melalui media kultur.



Gambar 1. Hasil identifikasi molekuler MAP pada feses sebelum dekontaminasi. M: DNA marker 100 bp; 1–3: ulangan sampel; K(+): kontrol positif MAP; NTC: no template control

Isolasi dan identifikasi dari sampel feses dan jaringan merupakan uji *gold standar* dalam pengujian *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* karena secara definitif dapat mendeteksi Paratuberkulosis (Collins dan Manning, 2004) dan media padat yang banyak digunakan untuk kultur MAP adalah *Herrold's egg yolk medium* (HEYM) dan *Löwenstein-Jensen* (LJ) dengan *mycobactine* (Kalis *et al.* 2000).

Ketahanan mikroba terhadap panas berbeda-beda satu sama lain. Faktor-faktor yang mempengaruhi ketahanan panas mikroba meliputi karakteristik mikroorganisme, jumlah mikroba, bahan dimana mikroba tumbuh dan jenis pemanasan (Jay, 2000). Ketahanan panas mikroba lebih tinggi terutama pada bahan dengan aktivitas air tinggi (Stewart, 2003) dan mikroba dengan aktivitas air yang rendah. *Staphylococcus* memiliki ketahanan panas yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan bakteri nonspora lainnya seperti *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus faecalis* dan *Lactobacillus lactis*. Karakter yang membedakan *Staphylococcus* adalah

kemampuannya memproduksi nuklease tahan panas (Gaman dan Sherington, 1992) dan aktivitas air yang rendah yaitu 0.87 sehingga *Staphylococcus* sangat tahan terhadap kondisi pengeringan (Lawley *et al.* 2008). Bakteri ini tahan pada lingkungan beku sampai beberapa tahun dan tahan pengeringan selama beberapa minggu. Sel vegetatif *Staphylococcus* dapat diinaktivasi pada suhu lebih besar dari 46°C namun sporanya masih mampu bertahan pada pemanasan 100–120°C (USDA, 2001).

Identifikasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada feses dengan perlakuan desinfektan amonium quartener

Hasil konfirmasi MAP dengan menggunakan media LJ dari feses steril yang dikontaminasi dengan MAP dan didesinfeksi dengan menggunakan amonium quartener ditampilkan pada Tabel 2. Pengamatan media kultur sampai dengan minggu ke-24 menunjukkan adanya pertumbuhan koloni pada setiap dosis desinfektan yang digunakan.

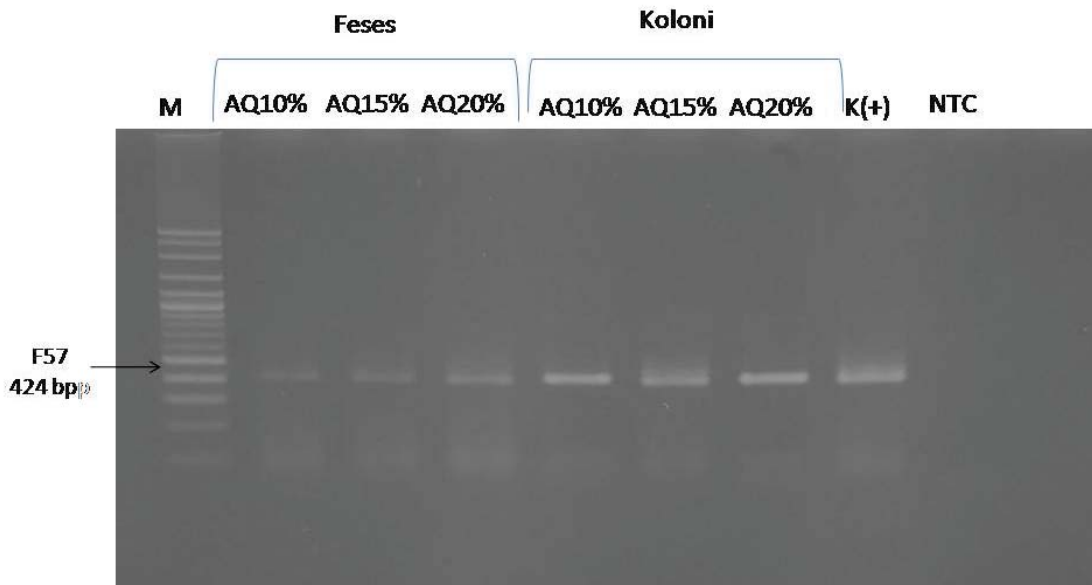
Tabel 2. Hasil isolasi sampel perlakuan dengan desinfektan amonium quartener pada media *Löwenstein-Jensen*

Perlakuan Desinfektan	Hasil Pengamatan
Amonium quartener 10%	Tumbuh pada minggu ke-15
Amonium quartener 15%	Tumbuh pada minggu ke-8
Amonium quartener 20%	Tumbuh pada minggu ke-8

Koloni yang tumbuh pada media LJ dikonfirmasi terhadap MAP dengan metode *nested* PCR. Amplifikasi DNA dilakukan terhadap sampel feses dan koloni yang tumbuh di media LJ. Hasil visualisasi produk PCR menunjukkan pita pada semua sampel yang diuji (Gambar 2). Sampel feses menunjukkan pita lebih tipis dibandingkan dengan sampel koloni. Hal ini kemungkinan terjadi karena koloni merupakan biakan murni yang menghasilkan ekspresi DNA yang lebih baik dibandingkan dengan feses dan karena adanya faktor penghambat

amplifikasi pada feses.

Senyawa amonium quartener bekerja pada membran sel, mendenaturasi protein, dan menghambat enzim dan pada kadar optimal dapat menyebabkan sel mengalami lisis sedangkan pada kadar yang lebih tinggi, terjadi denaturasi protein enzim bakteri (Siswandono dan Soekarjo, 1995). Penggunaan desinfektan golongan amonium quartener dengan dosis bertingkat 10%, 15% dan 20% pada penelitian ini belum menunjukkan hasil yang efektif dalam mendekontaminasi MAP. Bowman dan Shulaw (2001)



Gambar 2 Hasil identifikasi molekuler MAP pada feses dan koloni pada perlakuan dengan amonium quartener. M: DNA *marker* 100 bp; AQ: amonium quartener, K(+):kontrol positifMAP; NTC: *no template control*

menyatakan penggunaan desinfektan amonium quartener cukup efektif untuk mendekontaminasi bakteri kontaminan dan virus terutama untuk penggunaan pada permukaan, tetapi tidak efektif untuk bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* tetapi bisa menurunkan aktivitas bakteri tersebut.

Identifikasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada Feses dengan Perlakuan

Desinfektan Fenolik

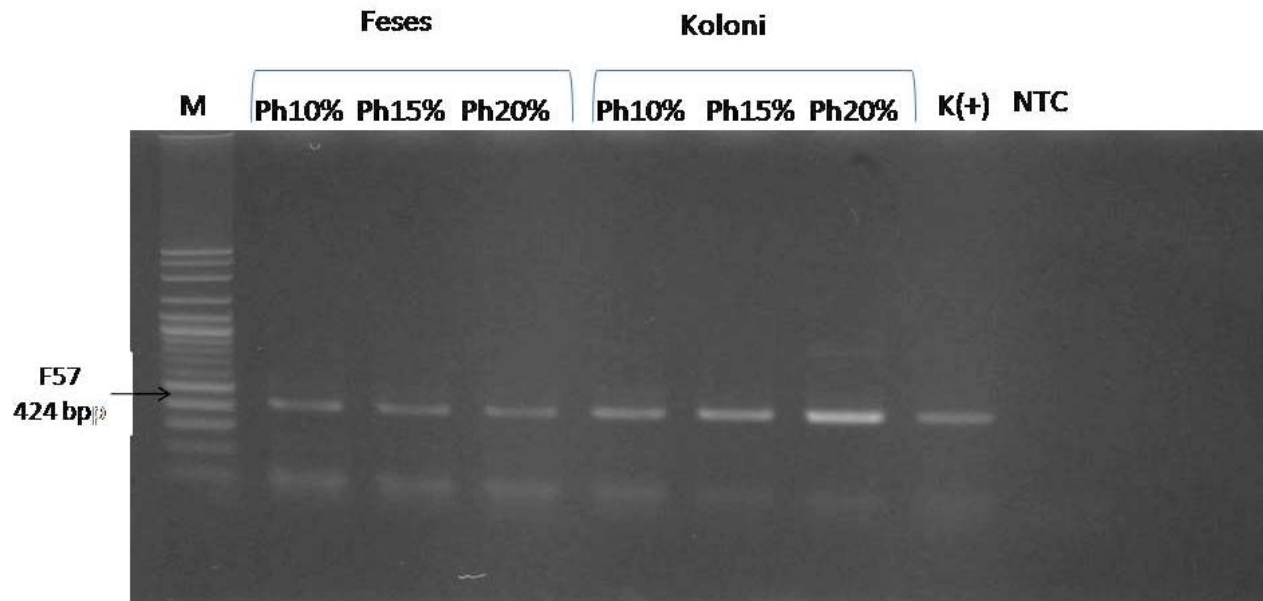
Pengamatan media kultur LJ pada sampel feses steril yang dikontaminasi dengan dengan MAP dan didesinfeksi dengan desinfektan fenolik sampai dengan minggu ke-24 menunjukkan koloni tumbuh pada semua sampel feses (Tabel 3). Pertumbuhan koloni pada setiap perlakuan ditemukan pada minggu yang berbeda, pada dosis 10% tumbuh pada minggu ke- 7 sedangkan untuk dosis 15% dan 20% tumbuh pada minggu ke- 14.

Tabel 3 Hasil isolasi sampel perlakuan dengan desinfektan fenolik pada media *Löwenstein-Jensen*

Perlakuan Desinfektan	Hasil Pengamatan
Fenolik 10%	Tumbuh pada minggu ke-7
Fenolik 15%	Tumbuh pada minggu ke-14
Fenolik 20%	Tumbuh pada minggu ke-14

Hasil amplifikasi DNA MAP pada sampel feses dan koloni yang tumbuh di media LJ menunjukkan pita amplikon pada semua sampel yang diuji (Gambar 3). Sampel feses menunjukkan pita lebih tipis dibandingkan dengan sampel koloni kemungkinan

karena koloni merupakan isolat murni dari MAP sehingga menghasilkan ekspresi DNA yang lebih terang serta adanya faktor penghambat amplifikasi dalam feses.



Gambar 3. Hasil identifikasi molekuler MAP pada feses dan koloni pada perlakuan dengan desinfektan fenolik. M: DNA marker 100 bp; Ph: Fenolik K(+):kontrol positif MAP; NTC: *no template*

Desinfektan golongan fenolik merupakan desinfektan yang efektif digunakan dalam mendekontaminasi peralatan dan ruangan dari bakteri, virus dan jamur tetapi tidak baik untuk beberapa jenis bakteri gram positif dan ragi (Rismana, 2002). Perubahan permeabilitas membran sel bakteri merupakan mekanisme kerja fenolik, terjadinya perubahan permeabilitas membran sel menyebabkan kebocoran sel yang esensial sehingga bakteri mengalami kematian (Siswandono dan Soekarjo 1995; Butcher dan Ulaeto, 2010). Sampel kelompok perlakuan dengan menggunakan desinfektan golongan fenolik dengan dosis 10%, 15% dan 20% masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri MAP di media kultur LJ. Hal ini menunjukkan bahwa desinfektan golongan fenolik dengan dosis tersebut tidak efektif dalam mendekontaminasi MAP pada feses sapi. Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan Bowman dan Shulaw (2001) yang menyatakan bahwa desinfektan golongan phenol efektif terhadap MAP. Hal ini kemungkinan karena perbedaan dosis desinfektan yang digunakan serta metode desinfeksi yang dilakukan.

Identifikasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada Feses dengan Perlakuan Desinfektan Formaldehid

Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri hingga minggu ke-24 memperlihatkan adanya pertumbuhan koloni pada sampel feses dengan perlakuan desinfektan formaldehid 10% pada minggu ke- 14, sedangkan untuk dosis 15% dan 20% tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni (Tabel 4). Amplifikasi DNA MAP dilakukan terhadap sampel feses dan koloni yang tumbuh pada media kultur LJ. Hasil visualisasi produk PCR untuk sampel perlakuan dengan desinfektan formaldehid menunjukkan hasil positif terhadap MAP yang ditandai dengan adanya pita pada semua sampel yang diuji (Gambar 4).

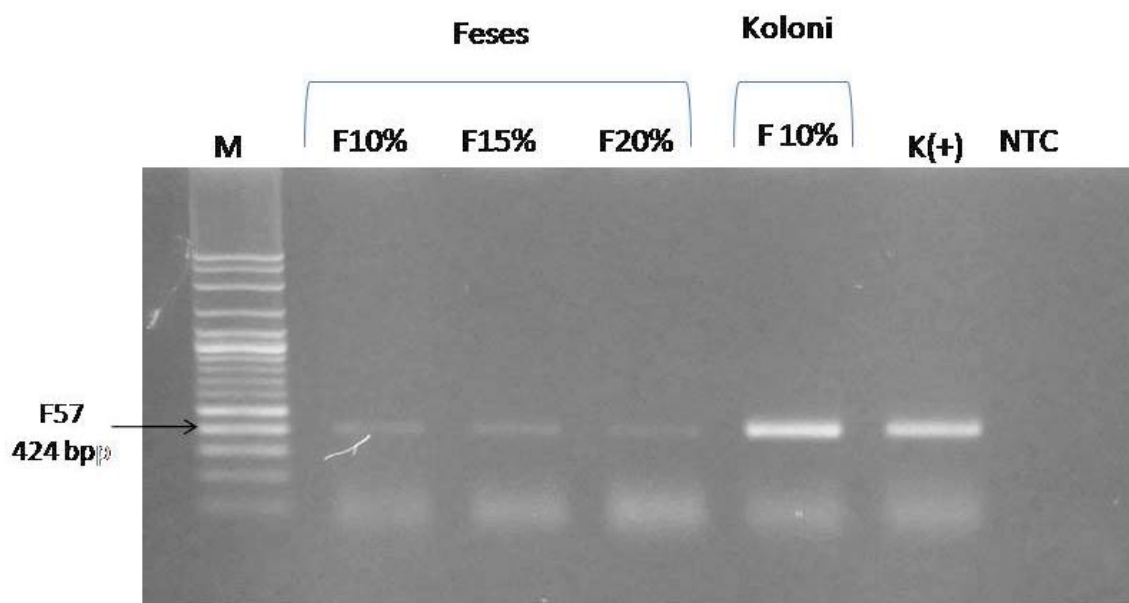
Desinfektan golongan formaldehid digunakan untuk membunuh mikroorganisme dalam ruangan, peralatan dan lantai. Desinfektan ini bekerja dengan cara denaturasi protein sel dan memiliki daya kerja yang cukup efektif dalam mendekontaminasi mikroorganisme cemaran, walaupun senyawa ini

mempunyai aktivitas antibakteri dengan kerja lambat (Siswandono dan Soekarjo 1995; Risma, 2002; Somani *et al.* 2011). Desinfektan formaldehid dosis 15% dan 20% dapat mendekontaminasi MAP pada feses. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ada koloni yang tumbuh pada media kultur LJ. MAP merupakan bakteri

yang resisten terhadap banyak jenis desinfektan. Beberapa desinfektan yang cukup efektif dalam mengeliminasi MAP antara lain formaldehid, golongan fenol, kreslik dan kalsium hipoklorid (Bowman dan Shulaw, 2001; EAZWV, 2008).

Tabel 4 Hasil isolasi sampel perlakuan dengan desinfektan formaldehid pada media *Löwenstein-Jensen*

Perlakuan Desinfektan	Hasil Pengamatan
Formaldehid 10%	Tumbuh pada minggu ke-14
Formaldehid 15%	Tidak tumbuh
Formaldehid 20%	Tidak tumbuh



Gambar 4. Hasil identifikasi molekuler MAP pada feses dan koloni dengan perlakuan desinfektan formaldehid. M: DNA *marker* 100 bp; F: Formaldehid; K(+): kontrol positif MAP; NTC: *no template control*

Berdasarkan data hasil PCR terhadap feses dan koloni yang tumbuh pada media LJ terlihat bahwa metode ini merupakan metode yang cukup bagus dan akurat untuk konfirmasi koloni yang tumbuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Shin *et al.* (2004) bahwa PCR dapat digunakan dan cukup baik untuk uji konfirmasi terhadap kultur dan mendeteksi bakteri sampai dengan 1 CFU per PCR dengan menggunakan primer F57 (Vansnick *et al.* 2004).

Secara keseluruhan, dari hasil pengujian dengan menggunakan media kultur LJ dan metode

nested PCR penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan desinfektan formaldehid dengan dosis 15% dan 20% dapat mendekontaminasi bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada feses sapi

Kesimpulan

Desinfektan formaldehid dengan dosis 15% dan 20% dapat mendekontaminasi bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada feses sapi.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Program Studi Mikrobiologi Medik, Sekolah Pasca Sarjana IPB. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Badan Karantina Pertanian Republik Indonesia atas beasiswa S2 yang telah diberikan. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Daftar Pustaka

- Adj, R. S. 2004. Isolasi dan uji serologi terhadap *Mycobacterium paratuberculosis* pada sapi perah. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. p 281 - 284. <http://kalteng.litbang.pertanian.go.id/eng/pdf/all-pdf/peternakan/fullteks/semnas/pro04-44.pdf>. Diakses pada 4 maret 2014.
- Adji, R.S. (2008). Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada sapi perah di Kabupaten Bandung dan Banyumas. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Blackwell, M. 2004. Farm planning ready to beat emergency disease outbreaks, poultry world. September 2004. *Proquest Agriculture Journal*.24. http://www.proquest.com/products-services/agr_science.html. Diakses pada 20 april 2014.
- Bowman, G.L. and W.P. Shulaw. 2008. Disinfection in On-Farm Biosecurity Procedures. Ohio State University Extension Fact Sheet. Veterinary Preventive Medicine. VME-0008-01:<http://ohioline.osu.edu/vme-fact/0008.html>. Diakses pada 20 April 2014.
- Butcher, W. and D. Ulaeto. (2010). Contact of activation of Orthopoxviruses By Household Disinfectants. Departemen of Biomedical Sciences, Dstl Porton Down. Philadelphia. 279-283.
- Collins, M.T. and E. Manning. (2004). Paratuberculosis in Dairy Cattle. School of Veterinary Medicine. Madison, University of Wisconsin. Wincosin.
- [EAZWV] Europe Association of Zoo and WildLife Veterinary (BE). 2008. Paratuberculosis or Johne's Diseases. EAZWV Transmissible Diseases Fact Sheet. Sheet No.91.<http://eaza.portal.isis.org/activities/tdf/actsheets/091%20Paratuberculosis20Or%20Johne%20s%20Disease.doc.pdf>. Diakses pada 15 Mei 2014.
- Gaman, P.M. and K.B. Sherington. (1992). Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan mikrobiologi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Greig, A., K. Stevenso, D. Henderson, V. Perez, V. Hughes, I. Pavlik, M. Hinesil, I. McKendrick, and J.M. Sharp. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol*. 37(6):1746–1751.
- Hasanova, L. And I. Pavlik. (2006). Economic impact of partuberculosis in dairy cattle herd: areview. *Vet Med*. 51(5):193-211.
- Jay, J.M. (2000). Modern Food Microbiology. Aspen Publisher, Inc Gheitrburg, Maryland.
- Kalis, C.H.J., J.W. Hesselink, H.W. Barkema, and M.T.Collins. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest*. 12:547-551.
- Lawley, R., L. Curtis, and J.Davis. (2008). The Book Safety Hazard Gudebook. Cambrige (UK): The Royals society of Chemistry.
- Nugroho, W.S. (2008). Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada sapi perah, susu pasteurisasi, dan susu formula lanjutan di wilayah Bogor. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [OIE] Office Internationale des Epizooties (FR). (2012). Paratuberculosis. In : Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organization for Animal Health. Paris.347–349.
- Rismana E. 2002. Mengenal bahan kimia desinfeksi. <http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/1004/07/cakrawala/index.htm>. Diakses pada 4 April 2014.
- Rutala, W.A. and D.J.Weber. (1999). Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high-level disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 20(1):69–7.

- Setyowati, R., E. Mudigdo, M.A. Gani Susanto, Trimurti and A.Azmi. (1986). Pengkajian paratuberkulosis (*Johne's disease*) pada sapi dan kerbau. *Bulletin Veteriner*.4:1-4.
- Shin, S.J., Y.F.Chang and C. Huang. (2004). Development of Polymerase Chain Reaction Test to Confirm *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Culture. *J Vet Diagn Invest*. 16(2):116-120.
- Siswandono dan B. Soekarjo. (1995). Kimia Medisinal. Airlangga University Press, Surabaya.
- Somani, S.B., W.N. Ingole and S.N.Kulkarni. (2011). Disinfection of Water by Using Sodium Chloride (NaCl) and Sodium Hypochlorite (NaOCl). *J Eng Reseach Stud*. 2(4):40-43.
- Stewart, C.M. (2003). Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxin. Ch.12 In: Hocking AD (Eds). Foodborne Microorganism Of Public Health Significance. Australian Institute of Food Science and Technology. Sidney: 359-280.
- [USDA] United State Departement of Agriculture (US). (2001). Foodborne Pathogenic Microorganism and Natural Toxin Handbook. Center food Safety & Aplied Nutriton. Washington.
- Wu, C.W., M. Livesey, S.K. Schmoller, E.J.B. Manning, H. Steinberg, W.C.Davis, M.J. Hamilton and A.M. Talaati. (2007). Invasion and Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during Early Stages of Johne's Disease in Calves. *J Infect Immun*. 75:2110-211.
- Vansnick, E., D.P. Rijk, F. Vercammen, D. Geysen, L. Rigouts and F. Portaels. (2004). Newly Developed Primers for The Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 100:197-204.