

DOSIS INAKTIF DAN KADAR PROTEIN *Yersinia enterocolitica* HASIL IRADIASI GAMMA

Irawan Sugoro¹ dan Sandra Hermanto²

¹Pusat Aplikasi dan Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN Jakarta
²Prodi Kimia – Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
Email: irawans@batan.go.id

ABSTRAK.

DOSIS INAKTIF DAN KADAR PROTEIN *Yersinia enterocolitica* HASIL IRADIASI GAMMA. *Yersinia enterocolitica* adalah salah satu penyebab penyakit mastitis coliform pada sapi perah. Penanganan penyakit dapat dilakukan dengan memanfaatkan iradiasi gamma untuk pembuatan bahan vaksin inaktif. Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengetahui dosis inaktif dan kadar protein sel bakteri *Yersinia enterocolitica* Y3 hasil iradiasi gamma. Tahapan percobaan adalah iradiasi gamma kultur bakteri dengan dosis 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 dan 1.500 Gy (laju dosis 1089,59 Gy/jam). Penentuan dosis inaktif diketahui dengan metode drop test dan kadar protein diukur dengan metode Lowry. Hasil percobaan menunjukkan bahwa dosis inaktif sel bakteri *Y. enterocolitica* adalah antara 800 Gy – 1.500 Gy. Iradiasi dengan dosis berbeda pada kultur bakteri menunjukkan adanya perubahan kadar protein sel bakteri yang tidak menentu dan adanya pengaruh yang signifikan dosis radiasi terhadap kandungan protein.

Kata kunci: *Yersinia enterocolitica* Y3, iradiasi gamma, inaktif, protein.

ABSTRACT.

INACTIVE DOSES AND PROTEIN CONCENTRATION OF GAMMA IRRADIATED *Yersinia enterocolitica*. *Yersinia enterocolitica* is one of bacteria which cause coliform mastitis in dairy cows. The bacteria could be inactivated by gamma irradiation as inactivated vaccine candidate. The experiment has been conducted to determine the inactive doses and the protein concentration of *Yersinia enterocolitica* Y3 which has been irradiated by gamma rays. The cells cultures were irradiated by gamma rays with doses of 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 and 1.500 Gy (doses rate was 1089,59 Gy/hours). The inactive dose was determined by the drop test method and the protein concentration of cells were determined by Lowry method. The results showed that the inactive doses occurred on 800 – 1500 Gy. The different irradiation doses of cell cultures showed the effect of gamma irradiation on the protein concentration that was random and has a significant effect on the protein concentration.

Key words: *Yersinia enterocolitica* Y3, gamma irradiated, inactive, protein.

1. PENDAHULUAN

Susu merupakan bahan makanan asal hewani yang mengandung nilai gizi tinggi. Kebutuhan akan susu sapi meningkat terus seiring dengan pengetahuan masyarakat akan pentingnya kebutuhan unsur gizi. Permintaan

susu di Indonesia meningkat, sedangkan produksi susu sapi dalam negeri hanya mampu memasok sekitar 380 ton atau 42,5% dari jumlah permintaan, selebihnya didatangkan dari luar negeri dalam bentuk susu bubuk [1]. Penyebab tidak dapat dipenuhinya kebutuhan susu dalam negeri tersebut, antara lain karena

populasi sapi perah yang masih terbatas jumlahnya dan adanya penyakit sapi perah. Penyakit pada sapi perah yang langsung memberikan dampak pada produksi susu yaitu penyakit mastitis [2]. Mastitis adalah suatu peradangan yang terjadi di dalam jaringan internal kelenjar susu. Mastitis dapat menyerang hewan menyusui dan penyakit ini telah menyebar ke seluruh dunia. Penyakit ini dapat bersifat akut dan sub akut, serta ditandai dengan perubahan fisik pada susunan air susu dan perubahan patologisnya [3]. Perkiraan penurunan terjadi sekitar 11,9 liter/hari menjadi 9,9 liter/hari, selain berupa penurunan kualitas susu, terdapat pula kerugian lain berupa meningkatnya biaya obat-obatan dan biaya perawatan [2].

Mastitis dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu ternak itu sendiri, mikroorganisme penyebab mastitis, dan faktor lingkungan. Penyebab utama mastitis adalah infeksi bakteri koliform, diantaranya *Enterococcus aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Yersinia enterocolitica*. Bakteri ini dapat menginfeksi kelenjar susu akibat adanya kontak antara kelenjar susu dengan feses, dimana feses merupakan sumber bakteri koliform [4].

Penyakit mastitis dapat diatasi dengan terapi antibiotik, namun pemanfaatan antibiotik menyebabkan mikroorganisme cenderung bersifat resisten dan meninggalkan residu pada susu. Residu antibiotik pada susu akan menyebabkan susu tidak aman untuk dikonsumsi karena dapat menimbulkan reaksi alergi, keracunan, dan mengakibatkan gangguan fisiologis pada manusia [5]. Alternatif lain untuk mencegah penyakit mastitis, adalah dengan pemberian vaksin. Vaksin merupakan suatu suspensi mikroorganisme yang telah dimodifikasi dengan cara dimatikan atau dilemahkan sehingga tidak menimbulkan penyakit dan dapat merangsang pembentukan kekebalan atau antibodi bila diinokulasikan. Saat ini, vaksin mastitis masih diimpor, dengan kisaran pasar 60-70%. Oleh karena itu, upaya pengembangan bahan vaksin mastitis dalam negeri memiliki nilai strategi dan peluang bisnis. Ketergantungan vaksin impor memungkinkan masuknya penyakit hewan melalui kontaminasi agen penyakit pada vaksin yang di impor. Hal ini lebih berbahaya lagi, jika menimbulkan efek mutasi pada vaksin aktif yang menyebabkan timbulnya penyakit baru [6].

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dengan cara kimia, pemanasan, dan iradiasi. Menurut Kochman [7], dalam pembuatan vaksin, cara

iradiasi lebih efektif dibandingkan dengan teknik lainnya. Keuntungan menggunakan iradiasi dalam pembuatan vaksin, yaitu durasi imunitas lebih panjang, lebih cepat menimbulkan respon imun, iradiasi juga dapat melemahkan mikroorganisme atau bibit penyakit yang selanjutnya dapat digunakan untuk pembuatan bahan vaksin dari penyakit tertentu [6].

Isolat yang dapat digunakan adalah *Y. enterocolitica* hasil isolasi susu sapi terinfeksi mastitis dengan level mastitis positif 3 (Y3) yang berasal dari isolat lokal yaitu daerah Garut, Jawa Barat. Isolat ini merupakan pencemar kedua setelah *K. pneumoniae* yang memiliki sifat resistensi tinggi terhadap beberapa antibiotik (*ceftazidime*, *ciprofloxacin*, *tetrasiklin*, dan *ampicillin*) sehingga sangat efektif untuk dijadikan bahan vaksin dan kinerjanya lebih optimal [8].

Bahan vaksin, yaitu bakteri yang akan diiradiasi harus dalam kondisi aktif metabolismenya dan memiliki dinding yang tipis. Kondisi tersebut terjadi pada fase midlog, yaitu fase pertengahan dari fase eksponensial. Selanjutnya isolat *Y. enterocolitica* diinaktivasi dengan iradiasi gamma untuk mengubah struktur dan komposisi proteinnya, di mana salah satu bagian yang berperan sebagai faktor virulensi adalah antigen protein [9]. Untuk menghasilkan vaksin yang baik, suspensi bakteri hasil inaktivasi sinar gamma harus dalam keadaan inaktif agar tidak membahayakan sel target tetapi masih mengandung antigen protein sebagai faktor virulensinya dalam keadaan utuh, untuk itu perlu dilakukan analisis kandungan protein sel. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai dosis iradiasi gamma untuk menginaktivasi *Y. enterocolitica* dengan tidak merusak struktur protein antigen yang akan digunakan sebagai bahan vaksin mastitis.

2. TATAKERJA

2.1. Bahan

Pada penelitian ini digunakan isolat bakteri *Y. enterocolitica* Y3 hasil isolasi dari susu sapi perah yang terinfeksi mastitis level 3. Bahan lainnya adalah *Tryptic Soy Broth* (TSB) Pronadisa, *Tryptic Soy Agar* (TSA) Pronadisa dan Larutan Lowry Merck.

2.2. Penentuan fase *mid log* *Y. enterocolitica* (Y3).

Kultur yang berumur 1 hari pada agar miring TSA diinokulasi sebanyak 3 ose ke dalam medium TSB 30 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam dan dijadikan sebagai kultur inokulum. Contoh diukur dengan spektrofotometer pada λ_{660} nm, kemudian sebanyak 10% v/v (10^{12} sel/mL atau nilai absorbansinya=1) dimasukkan ke dalam 30 mL medium TSB untuk pembuatan kurva tumbuh. Nilai absorbansi kultur diukur pada menit ke 0, 30, 60, 90, 150, 210, 270 dan 330. Hasil yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva tumbuh dengan sumbu x: waktu dan y: absorbansi dan ditentukan fase *mid log*. Fase *mid log* ditentukan berdasarkan kecepatan perubahan nilai absorbansi tertinggi [10].

2.3. Iradiasi *Y. enterocolitica* (Y3) dengan sinar gamma.

Kultur pada fase *mid log* disentrifugasi 10.000 rpm dan dibilas dengan 30 mL larutan NaCl 0,85% sebanyak 2 kali. Pelet yang diperoleh diencerkan hingga diperoleh jumlah sel sebanyak 10^8 sel/mL dan ditempatkan di dalam vial gelas sebanyak 10 mL. Selanjutnya diiradiasi gamma dengan dosis 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 dan 1.500 Gy di Iradiator *Gamma Chamber* 4.000 A dengan laju dosis 1089,59 Gy/jam. Kultur hasil iradiasi kemudian dihitung jumlah selnya dengan metode sebar untuk uji inaktivasi dilakukan dengan cara menanam kembali kultur hasil iradiasi pada medium TSA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 hari. Dari hasil yang diperoleh, didapatkan dosis inaktif kultur bakteri *Y. enterocolitica* (Y3) hasil iradiasi dengan cara melihat pertumbuhan bakteri *Y. enterocolitica* (Y3) pada medium TSA [10].

2.4. Pengukuran protein sel *Y. enterocolitica* (Y5) dengan metode Lowry.

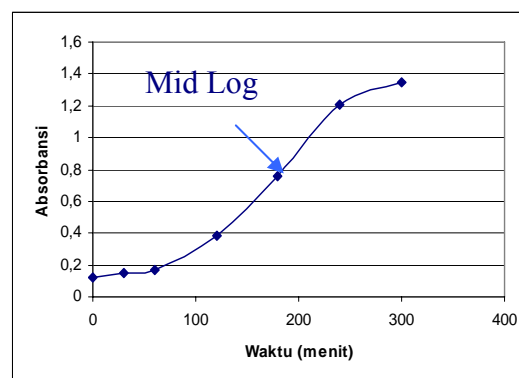
Kultur hasil iradiasi diukur kandungan protein ekstraselular dan intraselular. Contoh disiapkan untuk menentukan kandungan protein ekstraselular langsung menggunakan kultur hasil iradiasi. Selanjutnya untuk protein intraselular terlebih dahulu dilarutkan kultur hasil iradiasi sebanyak 0,5 mL ke dalam aseton (1 : 1) dan disonikasi selama 10 menit. Sebanyak 0,5 mL sampel ditambahkan dengan 2,5 mL larutan Lowry I dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL larutan Lowry

II dan dibiarkan selama 30 menit. Kandungan protein diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm [11]. Hasil yang diperoleh dianalisis statistik dengan uji ANOVA ($P \leq 0,05$) dengan bantuan program SPSS 11.5.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Kurva pertumbuhan *Y. enterocolitica* (Y3).

Kurva pertumbuhan sangat penting untuk menggambarkan karakteristik pertumbuhan bakteri sehingga memudahkan kultivasi (menumbuhkan) bakteri ke dalam suatu media dan mempertahankan fase yang diharapkan. Kultur isolat *Y. enterocolitica* yang diinokulasikan pada media TSB dan diinkubasi selama waktu tertentu, selanjutnya data jumlah bakteri dipetakan terhadap waktu inkubasi, sehingga diperoleh kurva seperti pada Gambar 1. Kurva tumbuh ini hanya mempunyai dua fase pertumbuhan yaitu fase logaritmik dan fase stasioner.



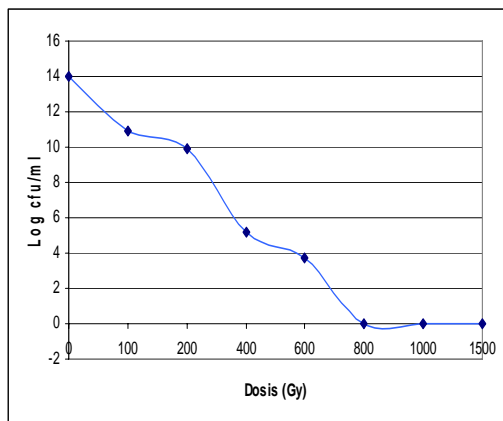
Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat *Yersinia enterocolitica* dalam medium TSB.

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat pada menit ke-0 sampai menit ke-60 terjadi awal fase logaritmik yang hampir menyerupai fase adaptasi. Pada menit ke-120 sampai menit ke-180 terjadi fase logaritmik yang cepat. Fase stasioner pada kurva pertumbuhan isolat *Y. enterocolitica* terlihat pada menit ke-240 sampai menit ke-300. Fase adaptasi pada kurva tumbuh ini tidak terlihat, dikarenakan sebelumnya bakteri telah ditumbuhkan pada medium yang sama, sehingga tidak terjadi penyesuaian diri terhadap lingkungan yang biasa disebut fase adaptasi.

Fase logaritmik menunjukkan terjadinya kecepatan sel membelah diri paling tinggi dengan waktu generasi pendek dan konstan yaitu terjadi pada menit ke-180 dengan nilai absorban 0,760/menit. Selama fase logaritmik terjadi metabolisme sel paling aktif sehingga dinding selnya tipis dan efek radiasi terjadi secara maksimal [6].

3.2. Dosis inaktivasi *Yersinia enterocolitica*

Iradiasi pada kultur isolat *Yersinia enterocolitica* dengan perlakuan dosis yang berbeda-beda (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500 Gy) menunjukkan adanya penurunan jumlah sel sebanding dengan meningkatnya dosis iradiasi yang diberikan (Gambar 2). Efek iradiasi pada isolat *Y. enterocolitica* tidak mengalami kerusakan secara total tetapi masih mengandung antigen atau masih memiliki faktor virulensi sehingga bisa digunakan sebagai bahan vaksin mastitis. Kondisi inaktif isolat *Y. enterocolitica* digunakan untuk meminimalisasikan sifat patogen yang ada.



Gambar 2. Hubungan dosis iradiasi gamma terhadap jumlah isolat *Y. enterocolitica*.

Pada dosis 0 sampai 600 Gy isolat *Y. enterocolitica* masih mengalami pertumbuhan, diperkirakan terjadi karena dua hal yaitu bakteri akan tetap hidup atau bakteri akan mengalami kematian. Bila tingkat kerusakan yang dialami sel tidak terlalu parah dan proses perbaikan berlangsung dengan baik dan tepat, maka sel bisa kembali normal seperti sebelum terkena radiasi. Bila proses perbaikan berlangsung tetapi tidak tepat maka akan dihasilkan sel yang tetap dapat hidup tetapi telah mengalami perubahan. Artinya sel tersebut tidak lagi seperti sel semula,

tetapi sudah menjadi sel yang baru atau abnormal tetapi hidup. Selain itu, bila tingkat kerusakan yang dialami sel sangat parah dan bila proses perbaikan tidak berlangsung dengan baik maka sel akan mati [12].

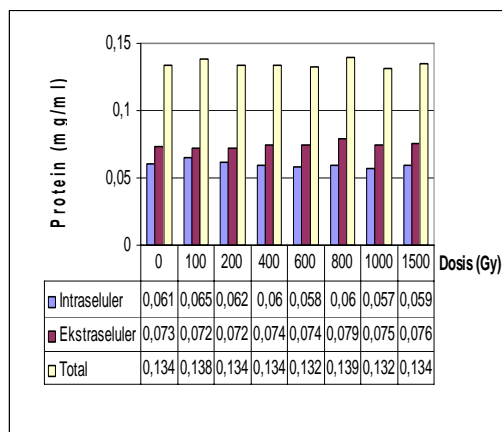
Pada dosis 800 sampai 1500 Gy isolat *Y. enterocolitica* sudah tidak mengalami pertumbuhan lagi, hal ini disebabkan bagian ekstraseluler maupun intraseluler isolat *Y. enterocolitica* mengalami kerusakan akibat iradiasi yang dapat mematikan sel dan jaringan, sehingga tidak mampu untuk melakukan replikasi kembali akibat dari penurunan proses metabolisme dalam sel [13]. Oleh karena itu, dosis 800 sampai 1500 Gy merupakan dosis yang optimal untuk menginaktivasi isolat *Y. enterocolitica* sehingga dapat digunakan sebagai bahan vaksin mastitis. Akan tetapi hal tersebut masih perlu ditunjang oleh data kandungan antigennya yang menentukan kualitas bahan vaskin, salah satunya protein.

3.3. Hasil pengukuran protein *Yersinia enterocolitica*

Jumlah protein pada isolat *Y. enterocolitica* yang diberi perlakuan dengan iradiasi menunjukkan hasil yang berfluktuasi pada setiap dosis yang berbeda (Gambar 3). Hal ini terjadi karena kecepatan peningkatan aktivitas pembelahan sel terjadi pada dosis tertentu dan tidak selalu mengikuti interval peningkatan dosisnya [14].

Akibat radiasi kadar protein dari isolat *Y. enterocolitica* mengalami perubahan baik pengurangan maupun penambahan jumlahnya. Kadar protein ekstraseluler dosis 0 Gy (sebagai kontrol), yaitu sebesar 0,073 mg/mL, setelah diiradiasi kadar protein ekstraseluler terendah terjadi pada dosis 100 dan 200 Gy, sebesar 0,072 mg/mL, sedangkan tertinggi terjadi pada dosis 800 Gy, sebesar 0,079 mg/mL. Untuk kadar protein intraseluler dosis 0 Gy, yaitu 0,061 mg/mL, setelah diiradiasi kadar protein intraseluler terendah terjadi pada dosis 1000 Gy, sebesar 0,057 mg/mL, sedangkan tertinggi terjadi pada dosis 100 Gy, sebesar 0,065 mg/mL. Untuk kadar protein total dosis 0 Gy, yaitu 0,134 mg/mL, setelah diiradiasi kadar protein total terendah terjadi pada dosis 600 dan 1000 Gy, sebesar 0,132 mg/mL, sedangkan tertinggi terjadi pada dosis 800 Gy, sebesar 0,139 mg/mL. Hal ini terjadi diduga karena sifat acak kerusakan yang ditimbulkan oleh iradiasi sinar gamma. Pengurangan dan pertambahan kadar protein dapat disebabkan oleh perubahan dan gangguan pada protein tersebut, baik aktivitas

maupun strukturnya. Akan tetapi hasil secara statistik tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata antar dosis perlakuan ($P \leq 0,05$).



Gambar 3. Histogram kadar protein isolat *Y. enterocolitica* hasil iradiasi sinar gamma.

Berdasarkan Gambar 3 terlihat bahwa jumlah kadar protein ekstraseluler lebih besar jika dibandingkan dengan jumlah kadar protein intraseluler. Hal ini disebabkan dinding sel bakteri merupakan bagian terluar sel yang akan mengalami dampak dari iradiasi paling tinggi, sehingga protein yang terdapat pada dinding sel akan mengalami perubahan komposisi sehingga sisi aktifnya terbuka. Efek radiasi terhadap molekul penting, antara lain pada molekul protein. Diasumsikan bahwa radiasi dapat mempengaruhi konfigurasi 3 dimensi molekul protein sehingga menjadi terbuka dan siap melakukan suatu reaksi [13].

Percobaan dengan menggunakan bakteri coliform, seperti *Escherichia coli* [8] dan *Klebsiella pneumoniae* [14] memperlihatkan hasil yang sama. Efek radiasi menyebabkan kandungan protein intraseluler dan ekstraseluler sel bervariasi untuk setiap dosisnya, akan tetapi secara statistik tidak terjadi perbedaan nyata.

Hasil percobaan di atas masih memerlukan penelitian lanjutan untuk menganalisis profil protein dengan menggunakan elektroforesis dan pengujian secara klinis terhadap hewan percobaan untuk memastikan apakah bakteri inaktif tersebut berpotensi sebagai bahan vaksin.

4. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fase *mid log Y. enterocolitica* terjadi pada menit

ke 180 dan dosis inaktif iradiasi gamma berkisar antara 800 – 1500 Gy. Kadar protein sel bervariasi menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma mempengaruhi kandungan antigen bahan vaksin.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih pada PATIR atas fasilitas yang diberikan dan Nunik Lelanangingtyas, Dinardi serta Neni Nuraeni atas bantuannya selama penelitian berlangsung.

6. DAFTAR PUSTAKA

- SUKADA, I. M., Kejadian Mastitis Subklinis Oleh *Streptococcus agalactiae* Di Daerah Semplak Bogor Dan Pengaruhnya Terhadap Kulit Susu. Tesis. IPB. Bogor (1996).
- ESTUNINGSIH, S., Patogenitas Mastitis Subklinis Pada Sapi Perah: Pendekatan Histologis Mastitis Subklinis Akibat Infeksi *Streptococcus agalactiae* Hemagglutinin Positif Pada Mencit. Disertasi. FKPH. IPB. Bogor (2002).
- DUVAL, J. Treating Mastitis without Antibiotics. Available: <http://www.eap.mcgill.ca/Publications/Eap69.htm>. Akses 27 Februari 2008. (1997)
- SUGORO, I. Pengontrolan Penyakit Mastitis dan Manajemen Pemerahan Susu. Artikel. BATAN (2004).
- Sajuthi, D. *Penuntun Praktikum Biologi Sel Molekuler*, IPB, Bogor. (1992)
- TETRIANA, D DAN SUGORO, I. Aplikasi Teknik Nuklir dalam Bidang Vaksin. *Buletin ALARA*. Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Jakarta (2007).
- KOCHMAN, M. Gama Radiation Proves Effective In vaccine Development. *Biopharmbulletin*. http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm_gamma-radiation. Sandiego. University of California. Akses 3 februari 2008 (2006).
- IKHMALIA, HERMANTO, S., DAN SUGORO, I., Profil Protein *Escherichia coli* Hasil Inaktivasi Sinar Gamma. Prosiding Seminar Nasional Biokimia, UI-Depok (2008).
- GIBCO INVITROGEN CORPORATION, Effectiveness of inactivation by gamma irradiation for powder trypsin products, Grand Island, USA (2000).

10. DARUSSALAM, M., Radiasi dan Radioisotop : Prinsip Penggunaannya dalam Biologi, Kedokteran dan Pertanian. Tarsito. Bandung (1996).
11. STRYER, L., Biokimia. EGC, Jakarta. (2000).
12. ALATAS, Z., Efek Paparan Radiasi pada Manusia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Jakarta (2005).
13. WAHYUDI, P., SUWAHYONO, HARSOYO. A. MUMPUNI DAN D. WAHYUNINGSIH, Pengaruh Pemaparan Sinar Gamma Isotop Cobalt-60 Dosis 0,25-1 kGy terhadap Daya Antagonistik *Trichoderma harzianum* pada *Fusarium Oxysporium*. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi-BATAN, Pasar Jum'at. Jakarta dan Fakultas Biologi-UNSOED, Purwokerto (2005) 10: 143-151.
14. SUGORO, I., TETRIANA, D. DAN WINDUSARI, Y., Dosis Inaktif dan Kadar Protein Isolat Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Hasil Iradiasi Gamma, Jurnal ATIR Vol. 3, PATIR – BATAN (2008).