

# Kajian Deteksi *Mycobacterium Avium* Subspecies *Paratuberculosis* pada Sapi Perah di Bogor

WIDAGDO SRI NUGROHO<sup>1</sup>, M. SUDARWANTO<sup>2</sup>, D.W. LUKMAN<sup>2</sup>, S. SETIYANINGSIH<sup>2</sup> dan E. USLEBER<sup>3</sup>

1. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

2. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Indonesia

3. Professur für Milchwissenschaften Institut für Tierärztliches Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig Universität, Giessen, Germany.

(Diterima dewan redaksi 30 Oktober 2009)

## ABSTRACT

NUGROHO, W.S., M. SUDARWANTO, D.W. LUKMAN, S. SETIYANINGSIH and E. USLEBER. 2009. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* of dairy cows in Bogor. *JITV* 14(4): 307-315.

Johne's disease (JD) or paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis in ruminants caused by infection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* subspecies (MAP). The disease has been detected serologically in Indonesia. It's potential to spread to other herds and could create great economic losses. The objectives of current study were to detect MAP in milk and faeces of dairy cows as well as to evaluate the association between farm management factors and presence of the bacteria in dairy cows in Bogor. The sample size was calculated using the formula to detect disease with the prevalence assumed to be 5% using 95% significant level. Milk and faeces samples were taken from 62 dairy cows which were suspected as suffering from MAP infection. Detection of MAP was done by isolation in Herrold' egg yolk medium with *mycobactin* J (HEYMj), acid-fast bacilli Ziehl-Neelsen staining, PCR IS900 and F57. Biochemical test to confirm *M. tuberculosis* presence was also conducted. Fifteen isolates of *Mycobacterium sp.* were found from the faeces samples but not from the corresponding milk samples. However, conventional PCR conducted on the isolate as well as the milk samples, gave negative results. Biochemical test proved that all *Mycobacterium sp.* isolates were not *M. tuberculosis*. This study indicated the prevalence of MAP in Bogor was less than 5%. These findings should be continued by observational study to achieve the comprehensive information at the cattle and herd level. Bovine Tuberculosis monitoring should be done also to protect dairy herd and food safety for the community.

**Key words:** Johne's disease, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Milk, Faeces

## ABSTRAK

NUGROHO, W.S., M. SUDARWANTO, D.W. LUKMAN, S. SETIYANINGSIH dan E. USLEBER. 2009. Kajian deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada sapi perah di Bogor. *JITV* 14(4): 307-315.

Penyakit Johne (JD) atau Paratuberkulosis adalah penyakit radang granulomatosa kronis saluran pencernaan pada ruminansia yang disebabkan oleh *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Penyakit ini telah terdeteksi secara serologis pada sapi perah di Indonesia dan sangat berpotensi menyebar ke peternakan lainnya serta merugikan secara ekonomi. Kajian ini bertujuan mendeteksi MAP pada susu dan feses serta menganalisis keterkaitan tatacara beternak terhadap keberadaan bakteri tersebut pada sapi perah di Bogor. Jumlah sapi contoh dihitung menggunakan rumus deteksi penyakit dengan asumsi prevalensi MAP 5% dan tingkat kepercayaan 95%. Contoh susu dan feses diambil dari 62 ekor sapi yang diduga terinfeksi MAP. Deteksi dilakukan dengan metode isolasi menggunakan *herrold' egg yolk medium* yang mengandung *mycobactin* J (HEYMj) dan tanpa *mycobactin* J (HEYM), pewarnaan tahan asam *Ziehl-Neelsen*, PCR konvensional menggunakan primer IS900 dan F57, serta uji biokimia untuk konfirmasi *M. tuberculosis*. Lima belas isolat *Mycobacterium sp.* tumbuh dari contoh feses dan tidak ada isolat *Mycobacterium sp.* tumbuh dari 62 contoh susu. Hasil negatif MAP diperoleh dari metode isolasi dan PCR konvensional terhadap semua contoh susu maupun isolat *Mycobacterium sp.* Hasil uji biokimia juga menunjukkan seluruh isolat *Mycobacterium sp.* bukan *M. tuberculosis*. Penelitian ini mengindikasikan prevalensi kasus MAP di Bogor kurang dari 5%. Hasil ini perlu dilanjutkan dengan kajian observasional untuk mendapatkan informasi MAP secara komprehensif di tingkat ternak dan peternakan. Monitoring kasus Tuberkulosis sapi juga perlu dilakukan untuk melindungi ternak perah nasional dan keamanan pangan bagi masyarakat.

**Kata kunci:** Penyakit Johne, *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis*, Susu, Feses

## PENDAHULUAN

Kasus Paratuberkulosis atau *Johne's disease* (JD) belum banyak diketahui di Indonesia. Penyakit ini

menyerang saluran pencernaan ruminansia yang disebabkan bakteri *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Bakteri MAP termasuk Gram positif dari keluarga *Mycobacteria*, spesies

*Mycobacterium avium complex* (MAC), berbentuk batang dengan ukuran 0,2-0,7 X 1-10 µm, non-motil, tahan asam, alkohol, dan panas, suhu pertumbuhan 25-45°C dan optimal 39°C, tumbuh sangat lambat 4 hingga 24 minggu (HOLT *et al.* 1994; SCAHAW, 2000; GRIFFITHS, 2003).

Sapi, kambing, atau domba yang baru lahir dan hewan muda merupakan hewan beresiko tinggi untuk terinfeksi MAP. Infeksi terjadi melalui susu atau pakan tercemar yang dikonsumsi atau hewan yang menjilati permukaan benda tercemar bakteri (HARRIS dan BARLETTA, 2001). Hewan lain yang juga dilaporkan sering terinfeksi adalah babi, rusa, dan bison (BUERGELT *et al.*, 2000; ACHA dan SZYFRES, 2003; MOTIWALA *et al.*, 2004). Burung diketahui dapat terinfeksi sedangkan kelinci diduga sebagai vektor JD terutama di peternakan dan satwa liar (BEARD *et al.* 2001; CORN *et al.* 2005).

Gejala klinis klasik pada kambing adalah kekurusan dan kurang nafsu makan, bulu kering dan kasar, tidak ada diare sedangkan pada sapi terkadang ditemukan diare kronis, dan produksi susu turun. Lesi yang ditimbulkan berupa radang granulomatosa pada usus sapi dan domba, terkadang dapat pula terjadi pada primata non-manusia. Perubahan histopatologi lainnya pada mammalia adalah *lymphadenitis* dan radang granulomatosa pada beberapa organ dalam (ACHA dan SZYFRES, 2003; KRUIZE *et al.*, 2006).

Di Denmark pada tahun 1965 prevalensi JD diketahui sebesar 2,3% dan menunjukkan kecenderungan meningkat pada tahun berikutnya sehingga pada tahun 1972 didapatkan angka prevalensi sebesar 9,8%. Di Belgia analisis ELISA terhadap 300 contoh serum sapi mengindikasikan 12% terinfeksi MAP, sedangkan di Spanyol teridentifikasi 67% sapi pada peternakan terinfeksi. Pada tahun 1980 survei nasional di AS dengan metode isolasi bakteri diketahui 1,6% dari 7000 ekor sapi yang diperiksa positif terinfeksi MAP. Tingkat kejadian pada sapi potong dan sapi perah menunjukkan perbedaan. Kajian di Belgia dan Belanda memperlihatkan hal tersebut, baik pada tingkat peternakan maupun pada tingkat ternak. Berdasarkan uji serologis, prevalensi infeksi MAP pada peternakan sapi pedaging sebesar 17,4% dan 1,2% pada tingkat ternak sedangkan pada sapi perah prevalensi tingkat peternakan sebesar 54,7% dan tingkat ternak sebesar 2,5%. Hasil kajian tersebut menyatakan, apabila angka sensitivitas dan spesifisitas kajian ditingkatkan menjadi 30% dan 99,5% maka prevalensi sebenarnya pada tingkat peternak akan mencapai 70,6% dan pada tingkat ternak 6,9% (SCAHAW, 2000). Di Indonesia, seropositif JD pernah dilaporkan oleh Balai Penelitian Veteriner pada tahun 1951 dan Balai Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) Medan pada tahun 1998 (ADJI, 2004). Tahun 2004 dilaporkan adanya seropositif (ELISA) pada sapi perah sebesar 1,67% dan

juga diperoleh isolat yang diduga MAP (ADJI 2004) namun uji konfirmasi dengan PCR F57 membuktikan isolat tersebut negatif MAP (NUGROHO *et al.*, 2008).

Pengaruh penyakit JD terhadap produksi susu juga sangat bervariasi. Sapi penderita JD sub klinis dapat mengalami penurunan produksi sebesar 6% mulai laktasi kedua dan dapat mencapai 16% sebelum sapi diafkir (BENEDICTUS *et al.*, 1987). Kondisi tersebut berbeda dengan temuan BUERGELT dan DUNCAN (1978) yang tidak melihat perbedaan berarti pada produksi susu dari sapi-sapi afkir yang didiagnosis JD.

Penderita JD selain mengalami perubahan klinis, patologis dan mengeluarkan MAP melalui feses, dapat pula mencemari susu melalui saluran getah bening meskipun kejadiannya lebih sering melalui feses (SWEENEY *et al.*, 1992). Keberadaan bakteri MAP dalam susu ini seringkali dikaitkan dengan kasus *Crohn's disease* (CD) yaitu penyakit pada manusia yang ditandai adanya radang granulomatosa kronis saluran pencernaan bagian bawah. Sifat tahan panas menjadikan bakteri MAP sangat berpotensi menjadi *milk-borne disease* dan dapat merugikan kesehatan masyarakat.

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan MAP di susu dan status infeksi pada sapi perah di Bogor. Hipotesis penelitian ini adalah ditemukannya MAP pada sapi perah di Bogor dengan tingkat prevalensi kasus sebesar 5%.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan Mei 2007 sampai Mei 2008 dengan mengambil populasi target adalah sapi perah peternakan rakyat di desa Cibungbulang Bogor yang tergabung dalam Koperasi Produksi Susu dan Usaha Peternakan (KPS) Bogor. Pegujian contoh dilakukan di Laboratorium Terpadu Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

### Penentuan jumlah contoh

Jumlah contoh dihitung berdasarkan rumus deteksi penyakit yang disusun CANON dan ROE, 1982 (diacu oleh MARTIN *et al.*, 1987):

$$n = \frac{(1-(1-\alpha)^{1/D}) (N-1/2(Se.D-1))}{Se}$$

Keterangan

n : jumlah contoh yang diambil

α : tingkat kepercayaan

D : jumlah hewan sakit

N : populasi hewan

Se: sensitivitas

Pada kajian deteksi penyakit dengan populasi sapi perah 5841 (NUGROHO, komunikasi pribadi 2005) dan asumsi prevalensi 5% dengan tingkat kepercayaan 95% dan sensitivitas 95% maka diperoleh jumlah contoh sebanyak 62 ekor. Pemilihan hewan contoh dilakukan secara *purposif* yaitu dengan memilih sapi yang terduga terinfeksi MAP dengan memiliki seluruh atau sebagian kriteria berikut yaitu umur di atas 2 tahun, kondisi badan kurus, menderita diare, produksi tinggi sekali/rendah sekali.

Contoh yang diperiksa adalah susu hasil pemerahan pagi hari dan feses dari sapi yang bersangkutan. Masing-masing bahan uji ditampung dalam plastik steril, diberi label, dan ditempatkan dalam kotak berpendingin. Kedua jenis contoh dijaga agar selalu terpisah antara susu dengan feses sejak perjalanan hingga dilakukan pengujian di laboratorium untuk menghindari kontaminasi silang.

Selain pengambilan contoh material untuk diuji di laboratorium juga dilakukan wawancara untuk mendapatkan informasi tatacara beternak dari para peternak. Pertanyaan bersifat tertutup dan terbuka untuk mendapatkan data tentang peternak/pegawai peternakan, tatacara beternak, dan kondisi ternak.

### Penyiapan contoh

Contoh susu sebanyak seratus mililiter dan masing-masing contoh dihomogenkan. Setiap contoh kemudian dituang ke dalam 2 buah tabung gelas sentrifus steril (ukuran 50 ml) dan disentrifus (Sorvall Super T21, USA) pada kecepatan 2500 X g selama 15 menit pada suhu 4°C. Fraksi cair dibuang sedangkan pelet pada masing-masing tabung diresuspensi dengan 1 ml akuades steril dan selanjutnya disatukan (dari asal contoh yang sama) dan diaduk hingga rata, 1 ml larutan diambil dan ditempatkan pada tabung Eppendorf 1.5 ml untuk analisis PCR dan selebihnya digunakan untuk isolasi bakteri (GRANT *et al.*, 2002).

Penyiapan contoh feses dilakukan mengacu pada STABEL *et al.* (2002) yang dimodifikasi. Feses seberat 3 g dilarutkan dengan 35 ml air distilasi steril dan dikocok dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Supernatan kemudian diambil sebanyak 30 ml dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 50 ml dan disentrifus pada kecepatan 1500 X g (Sorvall Super T21, USA) selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan kemudian dibuang dan pelet diresuspensi dengan 2 ml akuades steril kemudian 1 ml larutan diambil dan ditempatkan pada tabung Eppendorf 1,5 ml untuk analisis PCR sedangkan sisanya digunakan untuk analisis biakan.

### Isolasi MAP

Isolasi mengacu pada GRANT *et al.* (2002) dengan modifikasi. Satu mililiter suspensi yang diperoleh pada tahap sebelumnya dipindahkan ke dalam tabung gelas steril dan ditambahkan 10 ml 0,75% *hexadecilpyridinium chloride* (HPC) (Biomedical, USA) dan didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam. Suspensi disentrifus pada kecepatan 2500 X g selama 15 menit, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1000 µl PBS steril (Invitrogen, New Zealand). Suspensi pelet divorteks kemudian sebanyak 250 µl diinokulasikan ke dalam *Herrold's egg yolk medium* yang diperkaya dengan *mycobactin J* (HEYMj) (Becton Dickinson, USA) sebanyak 2 tabung dan 1 tabung pada *Herrold's egg yolk medium* yang tanpa *mycobactin J* (HEYM) (Becton Dickinson, USA). Media yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 minggu untuk mendeteksi adanya pertumbuhan bakteri dalam media. Pengamatan dilakukan setiap minggu apabila ditemukan koloni terduga *Mycobacterium sp.* pada media HEYMJ maupun HEYM selanjutnya dibuat preparat ulas. Preparat ulas diwarnai *acid fast bacteria* (AFB) dengan metode *Ziehl-Neelsen* (ZN) dan dikonfirmasi dengan PCR. Terhadap Isolat *Mycobacterium* yang tumbuh dilakukan uji biokimia untuk identifikasi *M. tuberculosis* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### Ekstraksi contoh susu dan bakteri untuk analisis PCR

Ekstraksi dilakukan sesuai prosedur dari Qiagen (Germany) produsen DNeasy® Tissue Kit. Suspensi pelet sebanyak 500 µl yang diperoleh dari tahap penyiapan contoh di atas, dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 2 ml kemudian disentrifus pada kecepatan 10 000 X g selama 30 menit. Supernatan dibuang dan 400 µl larutan penyangga TE *lysis* ditambahkan pada pelet dan divorteks hingga homogen. Selanjutnya suspensi dimasukkan ke dalam *freezer* -80°C selama 5 menit dan segera dipindahkan ke dalam penangas air pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap ini diulang satu kali kemudian suspensi diinkubasi di dalam penangas air suhu 80°C selama 20 menit. Kemudian suspensi didinginkan pada suhu 4°C dan selanjutnya ditambahkan 35 µl proteinase K dan 400 µl AL *Lysis buffer* (Qiagen, Germany), dikocok rata dengan vortek dan diinkubasi pada suhu 56°C selama satu malam. Tahap selanjutnya suspensi diekstraksi menggunakan DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Germany) sesuai petunjuk dari perusahaan.

## Amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik DNA MAP IS900 dan F57

Analisis PCR konvensional dilakukan menggunakan primer spesifik IS900 dengan oligonukleotida TJ1 (5'-GCT GAT CGC CTT GCT CAT-3') dan TJ2 (5'-CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA-3') seperti yang digunakan BULL *et al.* (2003) dan primer F57 yang terdiri oligonukleotida F57/R57 (F57:5'-CCT GTC TAA TTC GAT CAC GGA CTA GA-3' dan R57:5'-TCA GCT ATT GGT GTA CCG AAT GT-3') (VANSNICK *et al.*, 2004). Kondisi amplifikasi PCR yang digunakan adalah 1 siklus pada 94°C selama 10 menit kemudian 40 siklus pada 94°C selama 1 menit, 58°C selama 1 menit, dan 72°C selama 3 menit, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada 72°C selama 7 menit. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Singapore).

Produk PCR (amplikon) (13 µl) dicampur dengan 2 µl *loading dye solution* (MBI Fermentas, Germany) dan DNA *marker* yang digunakan adalah 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas, Germany) selanjutnya diseparasi menggunakan 2% *gel agarose electrophoresis* (Biozym, Germany) pada tegangan 120 V di dalam larutan 1x TAE buffer (0.04 mol/l Tris, 0.001 mol/l EDTA, pH 7,8). Setelah dielektroforesis selama 50 menit, agar gel direndam dalam larutan pewarna *ethidium bromide* 5 µl/ml (Sigma, Germany) selama 5 menit, dan gambar didokumentasikan dengan menggunakan UV (245 nm) trans-illuminator (Vilber Lourmat, France). Analisis data hasil isolasi dan PCR dilakukan secara deskriptif statistik.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis

Setelah diinkubasi selama 20 minggu pada HEYMj dan HEYM ditemukan beberapa isolat dari contoh susu yang tumbuh masing-masing 4 pada HEYMj dan 3 pada HEYM. Delapan belas isolat tumbuh dari 62 contoh feses, 11 isolat tumbuh pada HEYMj dan 7 isolat pada HEYM. Morfologi koloni tampak melingkar dengan tepi tak beraturan, berwarna putih-krem, permukaan kasar seperti terlihat pada Gambar 1.

Delapan belas isolat tersebut berasal dari 15 sapi dan berdasarkan pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan ZN hanya 15 isolat teridentifikasi sebagai *Mycobacterium sp.* Gambaran mikroskopik salah satu isolat *Mycobacterium sp.* yang ditemukan dari feses dan MAP referensi dapat dilihat pada Gambar 2. Pada pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 4000X terlihat ukuran bakteri isolat F56 (tanda panah pada Gambar 2A) lebih besar ukurannya

dari pada bakteri MAP referensi (tanda panah pada Gambar 2B).

Analisis PCR menggunakan primer IS900 dan F57 dilakukan langsung pada seluruh contoh susu segar dan isolat bakteri yang tumbuh. Hasil PCR terhadap seluruh contoh susu menunjukkan tidak adanya pita DNA target. Gambar 3 menunjukkan hasil pemeriksaan PCR dari contoh susu segar menggunakan primer F57.

Jelas terlihat pada Gambar 3 tidak ada pita DNA MAP dari contoh susu segar nomor SS18-34 (kolom 2-18). Pada contoh susu urutan nomor tersebut sengaja ditampilkan karena paralel dengan tumbuhnya isolat *Mycobacterium sp.* dari feses yaitu kode contoh feses FS20, FS21, FS29, dan FS33. Hal ini memperlihatkan keterkaitan dengan uji konfirmasi isolat dan mendapatkan gambaran kasus pada individu sapi yang bersangkutan.

Konfirmasi PCR terhadap 15 isolat *Mycobacterium sp.* dari feses juga menunjukkan hasil negatif baik menggunakan primer IS900 maupun F57. Gambar 4 memperlihatkan hasil konfirmasi isolat *Mycobacterium sp.* menggunakan PCR F57. Tidak satupun DNA teramplifikasi dari isolat-isolat tersebut (kolom 2-19).

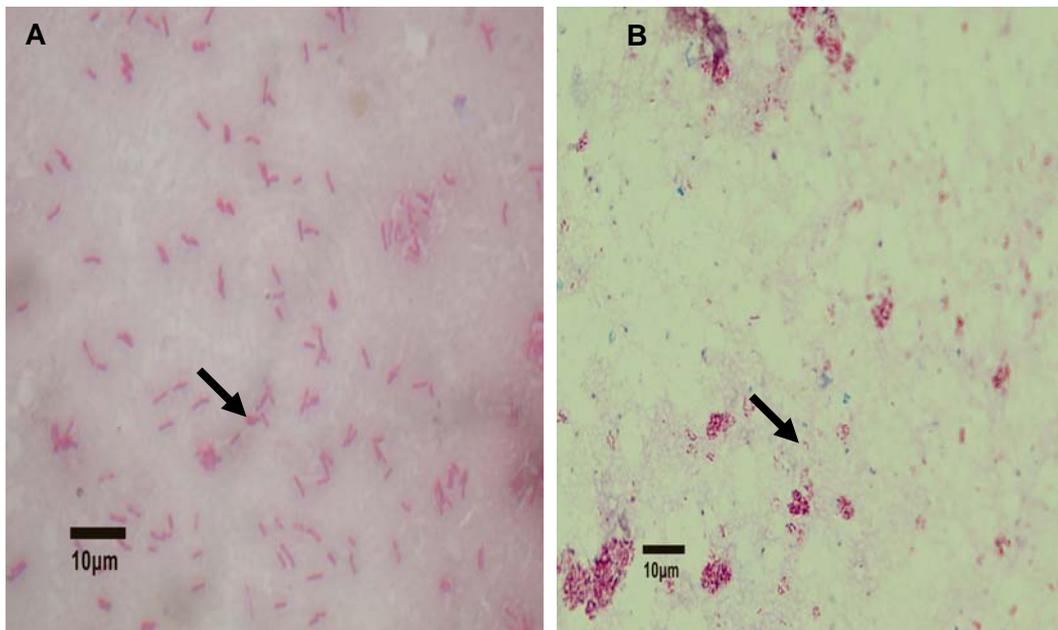
Seluruh pengujian laboratorik pada penelitian ini tidak menemukan MAP pada susu segar maupun feses. Beberapa isolat *Mycobacterium sp.* berhasil diisolasi dari feses. Hasil keseluruhan pemeriksaan laboratorik baik isolasi dan pengujian PCR untuk mendeteksi MAP dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh juga menyimpulkan bukan *M. tuberculosis*. Gambaran morfologi bakteri yang berhasil diisolasi memiliki ukuran yang lebih besar dari isolat referensi (Gambar 1) namun ukuran ini kurang dapat digunakan sebagai dasar identifikasi karena morfologi spesies dalam genus *Mycobacterium* tidak terlalu berbeda (HOLT *et al.*, 1994).

Metode isolasi konvensional menggunakan HEYM merupakan salah satu metode rutin untuk MAP. Ketergantungan MAP terhadap *mycobactin* J menyebabkan bakteri tersebut tidak mampu tumbuh dalam media HEYM tanpa senyawa tersebut (BARCLAY dan RATLEDGE, 1983). Penggunaan HEYMj dan HEYM secara paralel merupakan teknik isolasi yang sangat membantu untuk seleksi isolat. Penelitian BEARD *et al.* (2001) dan menemukan perubahan patologi pada jaringan usus pedet Frisian Holstein (FH) 6 bulan pascainokulasi sedangkan isolat MAP dari feses diperoleh 1-27 minggu pascainokulasi. Penelitian BEGG *et al.* (2005) menyatakan hanya 75% bakteri dapat diisolasi kembali melalui jaringan atau feses dari domba setelah 6 bulan diinokulasi MAP melalui mulut. Isolasi melalui feses bahkan hingga hari ke-330 pascainokulasi MAP juga tidak selalu ditemukan meskipun uji ELISA dan perubahan patologis telah menunjukkan tanda positif (KURADE *et al.*, 2004).



**Gambar 1.** Isolat *Mycobacterium sp.* yang tumbuh dari contoh feses pada media HEYMj dan MEYM. Koloni berwarna putih-krem dengan tepi tidak rata



**Gambar 2.** Perbandingan *Mycobacterium sp.* Isolat F56 (A) dan MAP referensi (B) dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen (perbesaran 4000x). Tanda panah menunjukkan bakteri yang dimaksud

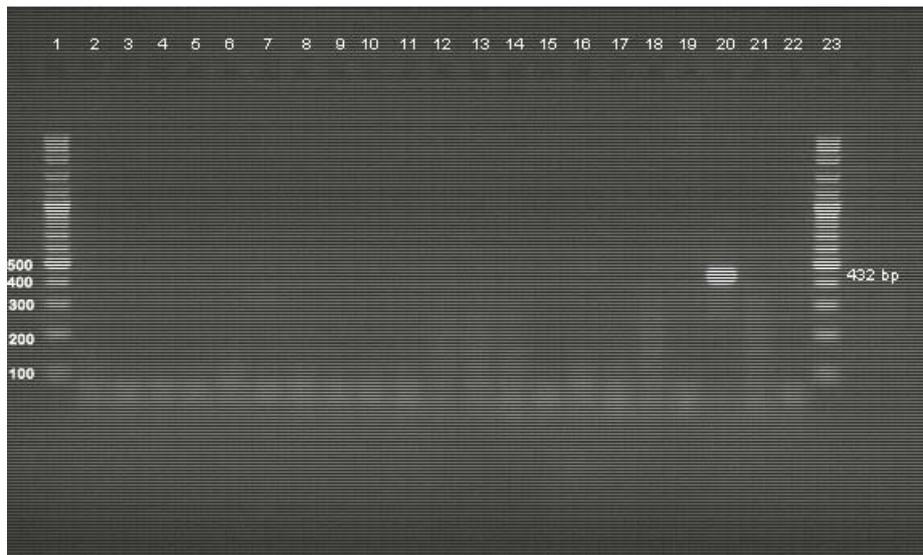
**Tabel 1.** Hasil lengkap deteksi MAP dari susu dan feses sapi perah di Bogor

Jenis Contoh	HEYMj		HEYM		AFB (ZN)		Uji biokimia TB	PCR IS900		PCR F57	
	+	-	+	-	+	-		+	-	+	-
Susu segar	4	58	3	59	0	7	Negatif	0	62	0	62
Feses	11	51	7	55	15	3	Negatif	0	15	0	15

AFB: *acid fast bacteria*



**Gambar 3.** Hasil PCR F57 dari ekstraksi langsung contoh susu segar. Tidak ditemukan pita DNA dari contoh susu segar dengan kode SS18-2234 (kolom 2-18), Kontrol positif MAP (kolom 19) *Mycobacterium avium* subspisies *avium* (MAV) (kolom 20), blanko (kolom 21), marker 100 bp (kolom 1 dan 22)



**Gambar 4.** Hasil PCR F57 dari isolat *Mycobacterium* sp. yang diperoleh dari contoh feses tidak ditemukan pita DNA pada isolat *Mycobacterium* sp. dengan kode FS2, FS3A, FS3B, FS12, FS13, FS16, FS20, FS21A, FS21B, FS29, FS33, FS51, FS53, FS54, FS56A, FS56B, FS58, FS60 (kolom 2-19), MAV (kolom 19), kontrol positif MAP (kolom 20), blanko (kolom 21 dan 22), marker 100 bp (kolom 1 dan 23)

Akurasi metode dan media diagnostik yang digunakan dalam penelitian ini telah diketahui. Kemampuan HEYMj menumbuhkan MAP dapat terjadi apabila dalam contoh mengandung setidaknya 10 sel/ml sedangkan kepekaan PCR dengan primer F57 mampu mendeteksi hingga  $10^3$  sel/ml. Metode PCR konvensional dalam penelitian ini menggunakan primer IS900 dan F57 yang memiliki kemampuan deteksi cukup tinggi (BULL *et al.*, 2003; VANSNICK *et al.*,

2004). Sebelum digunakan untuk penelitian ini primer tersebut juga telah diuji dengan beberapa isolat *Mycobacterium avium* subspisies *avium*, Gram positif lain, Gram negatif, dengan sensitivitas mendeteksi MAP hingga konsentrasi  $10^3$  sel/ml untuk primer F57 dan  $10^4$  sel/ml untuk primer IS900 (data tidak ditampilkan).

Belum diketahui konsentrasi/dosis terendah MAP secara pasti yang mampu menimbulkan penyakit pada

hewan. BEGG *et al.* (2005) menyatakan  $5 \times 10^8$  CFU/ml merupakan dosis inokulat MAP yang mampu menimbulkan penyakit sedangkan KURADE *et al.*, (2004) menggunakan dosis lebih tinggi yaitu  $1.8 \times 10^9$  CFU/ml. BEARD *et al.* (2001) juga menggunakan dosis berkisar  $4 \times 10^8$  CFU/ml sampai  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Tingginya dosis yang digunakan dalam penelitian-penelitian tersebut bertujuan untuk mengetahui perubahan-perubahan pada inang baik gejala klinis, histopatologi, serologis, dan pengeluaran MAP dari susu maupun feses. Konsentrasi MAP pada feses kasus juga sulit digunakan untuk mendeteksi di awal kasus. STABEL *et al.* (1998) menjelaskan bahwa pada kasus JD yang sudah mendekati fase terminal dapat diisolasi MAP dari feses hingga konsentrasi  $10^{10}$  CFU/g. Ketidak-konsistenan bakteri MAP berada dalam feses sering terjadi meskipun sudah ada perubahan patologis jaringan pada inang. Isolat dari feses dapat ditemukan secara rutin setelah kondisi kelukaan jaringan yang parah (derajat 4) yang umumnya terjadi setelah 150 hari (5 bulan) pasca-inokulasi. Isolat MAP dapat diperoleh pada susu sapi yang secara klinis sudah menunjukkan gejala diare kronis dan kehilangan berat badan namun hal ini tidak selalu ditemukan dari setiap hewan penderita (KURADE *et al.*, 2004). Gejala diare dapat menjadi salah satu indikasi adanya infeksi MAP.

Hasil negatif dari PCR dalam penelitian ini dapat diasumsikan bahwa hewan belum pada fase klinis MAP namun hal ini harus dilengkapi dengan uji serologis. Banyak peneliti menekankan untuk selalu menggunakan beberapa alat diagnostik dalam mendeteksi MAP (GRIFFITHS, 2003) dan akan lebih baik dilakukan surveilen sehingga perkembangan status kesehatan hewan dapat diikuti dari waktu ke waktu.

Sifat keberadaan *Mycobacterium sp.* dalam tubuh inang dapat dikategorikan menjadi 4 kelompok yaitu patogen obligat, patogen fakultatif, patogen oportunistik dan saprofit (SHANAHAN, 1994). GALAGHER dan JENKINS (1998) menyebutkan bahwa *Mycobacteria* zoonotik non tuberkulosis pada manusia diketahui 2 spesies yang dinyatakan zoonosis yaitu *Mycobacterium avium* dan *Mycobacterium marinum*. Selain kedua spesies tersebut, ada sekitar 13 spesies lain merupakan *Mycobacterium* oportunistik yang pada kondisi tertentu dapat menimbulkan sakit. Dikenal pula *Mycobacterium bovis* yang merupakan penyebab tuberkulosis pada sapi yang dapat menular ke manusia khususnya di negara berkembang (COSIVI *et al.*, 1998). *Mycobacterium bovis* pada manusia akan menimbulkan penyakit tuberkulosis dengan tanda klinis yang sama bila terinfeksi *M.tuberculosis* seperti batuk-batuk dan pada kondisi yang parah terjadi muntah darah.

Limabelas isolat *Mycobacterium sp.* yang diperoleh dari feses berasal dari 15 ekor sapi. Isolat-isolat tersebut bukan *M.tuberculosis* maupun MAP dan belum diidentifikasi spesiesnya untuk keperluan penelitian ini.

*Mycobacterium sp.* dalam feses bersifat saprofit di lingkungan tetapi dapat juga menjadi indikasi adanya infeksi pada hewan yang bersangkutan atau orang yang berada di sekitarnya. Temuan *Mycobacterium sp.* dalam penelitian ini mengarah pada beberapa spesies yang umumnya dapat menginfeksi sapi perah seperti *M.bovis*, *M. avium subspecies avium*, *M. marinum*, *M. phlei* atau yang lain. Kesadaran peternak/pegawai peternakan berperilaku sehat, menjaga kebersihan diri dan lingkungan akan memberikan kontribusi nyata dalam menjaga kesehatan diri, ternak, maupun masyarakat secara luas.

Kondisi peternakan dan tatacara beternak di Cibungbulang Bogor, tercermin dari hasil wawancara dan pengujian laboratorium. Peternakan umumnya dikelola oleh pegawai dengan latar belakang pendidikan paling banyak adalah Sekolah Dasar (SD) (66%). Para peternak/pegawai tersebut umumnya memiliki pengalaman memelihara sapi perah empat tahun lebih (78%), belum pernah mendapat pelatihan (90%), namun selama ini mereka sering mendapatkan penyuluhan (62%). Hampir semua peternak/pegawai peternakan tinggal di lokasi perkandangan bersama keluarga. Seluruh peternak/pegawai peternakan (100%) sebagai perokok dan 20% dari mereka mengaku menderita batuk kronis yang tidak diketahui penyebabnya. Pemeriksaan kesehatan mereka tidak dilakukan secara rutin, hanya 32% yang pernah merasakan diare agak berat tanpa mengetahui penyebab sesungguhnya. Semua peternak melakukan pencucian ambing sebelum pemerahan namun masih ditemukan 1 ekor (1,6%) yang masih kotor saat diperah sedangkan kondisi kandang saat pemerahan 96,8% bersih. Setelah pemerahan 77,4% peternak membersihkan puting dengan air dan hanya 22,6% menggunakan larutan desinfektan. Lokasi pembuangan air limbah peternakan dan feses dialirkan ke kebun di sekitar kandang. Sebanyak 41,9% sapi dilaporkan pernah menderita diare dengan dugaan penyebab adalah perubahan pakan (96,2%).

Gambaran diatas memperlihatkan bahwa tatacara beternak yang dilakukan para peternak/pekerja peternakan masih kurang memperhatikan sanitasi dengan baik, meskipun para peternak/pegawai peternakan sudah mengikuti penyuluhan (62%) namun tidak dilakukan secara konsisten. Latar belakang pendidikan para peternak/pegawai peternakan umumnya adalah sekolah dasar (SD) (66%) dengan pengalaman beternak lebih dari empat tahun (78%) maka kebiasaan mengelola ternak yang diperoleh secara turun temurun dari orang tua atau peternak lain umumnya sulit diperbaiki. SUDARWANTO (1999) menyatakan bahwa kondisi sanitasi yang buruk menyebabkan meningkatnya kasus zoonosis. Kondisi lain yang sering ditemukan di peternakan rakyat adalah sapi sering menderita gangguan sistem pernafasan. Faktor penting yang sangat berpengaruh terhadap

penyebaran penyakit dan sulitnya penyakit disembuhkan adalah peternak/pekerja kandang yang tidak mengerti/tidak sadar tentang penyakit pada hewan seperti mastitis dan faktor-faktor yang menyebabkannya.

Beberapa daerah tidak lagi melakukan uji tuberkulinosi secara rutin untuk mengontrol kasus Tuberkulosis sapi, sehingga temuan penelitian ini menjadi informasi yang penting dipertimbangkan untuk mengantisipasi kasus yang disebabkan oleh *M.bovis* ataupun *M. avium complex*. Tahun 2008 kembali ditemukan seropositif MAP pada sapi perah dengan jumlah yang lebih banyak dari tahun sebelumnya bahkan diperoleh 2 isolat positif MAP yang tumbuh pada HEYM dan telah dikonfirmasi menggunakan metode PCR IS900 dan F57 (ADJI, 2008).

Kasus JD yang dilaporkan ADJI (2008) perlu tindak lanjut dengan kajian observasional untuk menganalisis lebih mendalam prevalensi dan sebaran kasus. Kajian juga diarahkan untuk mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya kasus di lapangan sehingga dapat disusun prosedur baku penanganan kasus serta program pencegahan dan pengendaliannya. Kajian juga perlu diperluas pada jenis tenak lain seperti domba dan kambing yang juga berpotensi tertular MAP. Kajian juga perlu diperluas pada produk hasil ternak selain susu segar seperti susu pasturisasi, susu formula, keju dan daging. Data tersebut akan menjadi informasi penting bagi pemerintah untuk menetapkan status negara terhadap penyakit ini. Kejelasan status ini penting untuk keperluan strategi nasional berkaitan dengan tata perdagangan bebas dunia khususnya komoditi peternakan dan hasil-hasilnya.

Tindakan pengawasan terhadap importasi ternak dari negara-negara bertatus endemis JD perlu diperketat sebelum kasus JD di Indonesia menjadi jelas. Pelacakan rekam jejak kesehatan dan pengujian laboratorik terhadap MAP di negara asal untuk sapi-sapi dan hewan lain sebelum diimpor ke Indonesia. Ternak yang terlanjur masuk dan teridentifikasi terinfeksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* harus segera dimusnahkan untuk mencegah penyebaran penyakit.

Surveilans Paratuberculosis dan Tuberkulosis sapi sangat diperlukan untuk menjamin kesehatan ternak, kesehatan peternak/pekerja peternakan, dan keamanan produknya bagi masyarakat.

## KESIMPULAN

Tidak ditemukan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada susu segar maupun feses sapi perah di wilayah Bogor sehingga dengan demikian asumsi prevalensi Paratuberculosis pada sapi perah di Bogor kurang dari 5%. Ditemukan isolat *Mycobacterium sp.* dari feses yang tidak teridentifikasi

sebagai *Mycobacterium tuberculosis* maupun *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

## DAFTAR PUSTAKA

- ACHA, P.N. and B. SZYFRES. 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Vol I. 3<sup>rd</sup> ed. Pan America Health Organization Washington. pp. 283-297.
- ADJI, R.S. 2004. Isolasi dan uji serologi terhadap *Mycobacterium paratuberculosis* pada sapi perah. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner; Bogor, 4-5 Agustus 2004. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. hlm 281-284.
- ADJI, R.S. 2008. Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada sapi perah di Kabupaten Bandung dan Banyumas. [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- BARCLAY, R. and C. RATLEDGE. 1983. Iron-Binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intacellulare*, *M. scrofuaceum*, and mycobactin-dependent *M.paratuberculosis* and *M.avium*. *J. Bacteriol.* 3: 1138-1146.
- BEARD, P.M., K. STEVENSON, A. PIRIE, K. RUDGE, BUXTON, S.M. SINCLAIR, L.A. WILDBLOOD, D.G. JONES and J.M. SHARP. 2001. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3080-3084.
- BEGG, D.J., R. O'BRIEN, C.G. MACKINTHOS and J.F.T. GRIFFIN. 2005. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immunol.* 73: 5603-5611.
- BENEDICTUS, G., A.A. DIJKHUIZEN and J. STELWAGEN. 1987. Economic losses due to Paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Record.* 21: 142-146.
- BUERGELT, C.D., and J.R. DUNCAN. 1978. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *JAVMA.* 173: 478-480.
- BUERGELT, C.D., A.W. LAYTON, P.E. GINN, M. TAYLOR, J.M. KING, P.L. HABECKER, E. MAULDIN, R. WHITLOCK, C. ROSITTER and M.T. COLLINS. 2000. The pathology of spontaneous Paratuberculosis in North American Bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37: 428-438.
- BULL, T.J., E. J. MCMINN, K.S. BOUMEDINE, A. SKULL, D. DURKIN, P. NEILD, G. RHODES, R. PICKUP, and J. HERMON-TAYLOR. 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2915-2923.
- CORN, J.L., E.J.B. MANNING, S. SREEWATSAN and J.R. FISCHER. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6963-6967.

- COSIVI, O., J.M GRANGE, C.J. DABORN, M.C. RAVIGLIONE, T. FUJIKURA, D. COUSINS, R.A. ROBINSON, H.F.A. HUCHZERMAYER, I. DE KANTOR, and F.X. MESLIN. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59–70.
- GALLAGHER, J. and P.A. JENKINS. 1998. Mycobacterial Diseases. In: *Zoonoses. Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. S.R. Palmer, L.Soulsby, D.I.H. Simpson (Eds). Oxford Univ. Press. New York. pp 161-162.
- GRANT, I.R., H.J. BALL and M.T. ROWE. 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2428-2435
- GRIFFITHS, M. 2003. *Mycobacterium paratuberculosis*. Di dalam: *Food-borne Pathogenes*. C.W. Blackburn and P.J. McClure (Eds). 1<sup>st</sup> Ed. North America: Woodhead and CRC Pr. pp. 489-500
- HARRIS, N.B. and R.G. BARLETTA. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489-512.
- HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. JSTALEY and S.T. WILLIAMS. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> Ed. Maryland USA, Williams & Wilkins. p 597.
- KRUZE, J., M. SALGADO, E. PAREDES, A. MELLA and M.T. COLLINS. 2006. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 476-479.
- KURADE N.P., B.N. TRIPATHI, K. RAJUKUMAR and N.S. PARIHAR. 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41: 378-387.
- NUGROHO, W.S., R.S. ADJI and A.E.T.H. WAHYUNI. 2008. Uji konfirmasi isolat lokal terduga *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* menggunakan *polymerase chains reaction* (PCR) F57. *JITV.* 13: 127-132.
- MARTIN, S.W., A.H. MEEK and P. WILLEBERG. 1987. *Veterinary epidemiology principles and methods*. Univ. Press, Iowa States. p 35.
- MOTIWALA, A.S., A. AMOSIN, M. STROTHER, E.J.B. BANNING, V. KAPUR and S. SREEVATSAN. 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2703-1712.
- [SCAHAW] Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. 2000. Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis., European Commission, Directorate-General Health & Consumer Protection.
- SHANAHAN, J.F. 1994. *Mycobacteria*. In Bailey and Scott's *Diagnostic Microbiology*. L.M. Potts (Ed). USA. Mosby-Year Book Inc. p 591.
- STABEL, J.R. 1998. Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81: 283-288.
- STABEL, J.R., S.J. WELLS and B.A. WAGNERS. 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J. Dairy Sci.* 85: 525-531.
- SUDARWANTO, M.B., 1999. Usaha peningkatan produk susu melalui program pengendalian mastitis sub klinis, [Orasi Ilmiah Guru Besar] Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK and A.E. ROSENBERGER. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes. of Infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 66-171.
- VANSNICK, E., P. DE RIJK, F. VERCAMMEN, D. GEYSEN, L. RIGOUTS and F. PORTAELS. 2004. Newly developed primers for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100: 197-204.