

MASTECH (MASTITIS DETECTION TECHNOLOGY) METODE DETEKSI MASTITIS BERBASIS BIOSURFAKTAN ASAL *Pseudomonas sp*

Faizal Agung Pratomo¹⁾, Paura Rangga Zobda²⁾, Farras Shanda³⁾, Muhamad Wildan⁴⁾, Dimas Rizky Eerste Putra⁵⁾

¹Prodi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
email : pratomo_faizalagung@yahoo.com

²Prodi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
email : paurazobda@yahoo.com

³Prodi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
email : dafys_shanda@yahoo.com

⁴Prodi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
email : m.wildan25@yahoo.com

⁵Prodi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
email : dimasputra78@yahoo.com

Abstract

Today, the needs of milk in Indonesia is increasing, while in terms of quality can't meet national needs. One reason is mastitis disease. Mastitis is inflammation of udder that marked changes in physical and chemical milk with or without pathological of the mammary gland. Mastitis detection currently used is California Mastitis Test (CMT), CMT weakness is expensive and use of chemicals. so that, necessary new methods, one of which uses biosurfactants. The advantages of using biosurfactants are environment receiving, as biodegradable and non-toxic. Biosurfactants have potential in management and protection of the environment, so it could be mastitis detection tool.

Keywords: Milk, mastitis, CMT, biosurfactants, *Pseudomonas sp*.

1. PENDAHULUAN

Susu berperan penting dalam memenuhi kebutuhan protein hewani bagi masyarakat Indonesia. Permintaan susu dari waktu ke waktu semakin meningkat, hal ini terjadi karena jumlah penduduk yang terus meningkat dan pendapatan masyarakat juga meningkat. Produksi susu secara nasional belum dapat mencukupi kebutuhan susu dalam negeri karena permintaan susu secara nasional dari segi kuantitas mungkin dapat terpenuhi tetapi secara kualitas belum dapat memenuhi keinginan produsen susu dan konsumen, sehingga produksi susu dalam negeri baru dapat diterima sebanyak 40 % sedangkan 60 % lainnya dipenuhi dari susu impor. Ketidakmampuan dalam memenuhi permintaan susu tersebut dikarenakan produktivitas sapi perah Indonesia rata-rata masih rendah baik secara kuantitas maupun

kualitas (Rosena, 2010). Salah satu penyakit yang berdampak terhadap produksi susu adalah mastitis atau radang ambing.

Mastitis merupakan suatu peradangan pada jaringan interna kelenjar susu atau ambing yang ditandai oleh perubahan fisik maupun kimia air susu dengan disertai atau tanpa disertai patologis pada kelenjar mammae (Morin and Hurley, 2003; Salasia dkk, 2004) dan merupakan penyakit yang banyak sekali menimbulkan kerugian pada peternakan sapi perah di seluruh dunia (Subronto, 2003). Mastitis disebabkan oleh bermacam-macam penyebab (Blood and Henderson, 2007), di antaranya karena trauma atau gangguan fisiologis (Andrews, 2000), tetapi kerugian ekonomi penyakit ini seringkali disebabkan adanya infeksi bakteri (Dodd and Booth, 2001), diantaranya *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis (Quinn et al., 2002, Subronto, 2003). Staphylococcus aureus menjadi perhatian khusus karena merupakan patogen utama dari penyebab mastitis pada sapi perah (Prescott et al., 2003).

Menurut Sudono, Rosdiana, Setiawan (2003) mastitis yang sering menyerang sapi perah ada 2 macam yaitu mastitis klinis dan subklinis. Mastitis klinis tanda-tandanya dapat dilihat secara kasat mata seperti susu yang abnormal adanya lendir dan penggumpalan pada susu, puting yang terinfeksi terasa panas, bengkak dan sensitive bila disentuh saat pemerahan. Sedangkan mastitis subklinis tanda-tanda yang menunjukkan keabnormalan susu tidak kelihatan kecuali dengan alat bantu atau metode deteksi mastitis.

Mastitis subklinis adalah peradangan ambing yang tidak menunjukkan gejala klinis tetapi pada pemeriksaan susu secara mikroskopik terdapat peningkatan jumlah sel somatik lebih besar dari 400 000 sel setiap ml susu (Sudarwanto et al. 2006; IDF 1999). Sapi yang menderita mastitis subklinis mengalami penurunan produksi kualitas dan komposisi susu. Mastitis subklinis di Indonesia mencapai 97% dari keseluruhan kejadian mastitis. Mastitis subklinis merupakan penyakit kompleks yang dapat disebabkan oleh bakteri, virus, khamir dan kapang (Subronto, 2003).

Mastitis subklinis dianggap lebih berbahaya karena tidak diketahui gejalanya dan menimbulkan kerugian yang sangat tinggi. Mastitis subklinis menyebabkan penurunan produksi susu mencapai 15%. Kerugian lain disebabkan peningkatan biaya produksi untuk pengobatan, terkadang sapi yang terkena mastitis subklinis juga harus dikeluarkan dari peternakan lebih awal karena biaya pemeliharaan yang lebih tinggi dari produksinya. Kerugian ekonomis karena mastitis subklinis dapat mencapai Rp. 10 000 000/ekor/tahun (Rahayu 2009). Untuk mengurangi kerugian akibat mastitis subklinis, diperlukan adanya alat deteksi mastitis.

California Mastitis Test (CMT), merupakan satu-satunya screening test untuk

mastitis subklinis yang bisa digunakan di luar tubuh sapi. Reaksi CMT harus dinilai selama 15 detik pencampuran karena reaksi lemah akan menghilang setelah itu (Ruegg, 2002). Reagen CMT adalah detergen plus bromcresol purple (sebagai indikator pH). Reagen terdiri dari alkyl aryl sulfonate 3%, NaOH 1,5%, dan indikator Broom kresol purple. Alkyl aryl sulfonat merupakan sebuah deterjen yang merupakan bahan kimia yang terdapat dalam reagen "Scalm Mastitis Test" dan mengandung pH indikator. Alkyl aryl sulfonat mempunyai sensitivitas yang besar pada pH susu (Subronto, 2004). Sehingga diperlukan adanya metode baru untuk mengurangi penggunaan bahan kimia, salah satunya dengan penggunaan biosurfaktan. Keuntungan yang paling signifikan penggunaan bakteri surfaktan dibanding kimia surfaktan adalah penerimaan lingkungan, karena kemampuan biodegradasi dan tidak beracun untuk lingkungan. Beberapa keuntungan dari biosurfaktan diantaranya adalah toksisitas yang rendah, biodegradabilitas, selektif, aktivitas spesifik dalam suhu ekstrem, pH, dan Salinitas, serta produksi melalui fermentasi. Hal ini memiliki potensi dalam perlindungan dan manajemen lingkungan (Abouseoud, 2007).

Biosurfaktan dihasilkan oleh mikroorganisme, adanya keanekaragaman sumber mikroorganisme menghasilkan biosurfaktan dengan struktur kimia, fungsi dan manfaat yang berbeda. Parra et al. (1989) menyatakan bahwa bakteri penghasil biosurfaktan banyak ditemukan pada daerah yang tercemar minyak maupun lemak. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk memperoleh isolat bakteri penghasil biosurfaktan asal susu yaitu *Pseudomonas sp.*

2. METODE

Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* secara deskriptif yang bertujuan untuk mengisolasi bakteri penghasil biosurfaktan asal susu. Data yang diperoleh disajikan dalam nilai rataan atau disajikan secara kualitatif jika uji yang

dilakukan berkaitan dengan karakterisasi isolat yang diteliti.

Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif dari hasil karakterisasi fenotipe untuk mengetahui isolat bakteri yang di koleksi dan analisis statistik deskriptif untuk mengetahui karakterisasi profil protein.

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Sampel susu diambil langsung dari peternak disekitar Malang Raya. Pelaksanaan penelitian di laboratorium berlangsung selama 5 bulan.

Alat dan bahan

Alat yang diperlukan antara lain :

Cawan petri, tabung reaksi, objek glass, jarum ose, Bunsen, beacker glass, erlenmeyer, gelas ukur, pegaduk kaca, oven, vortex, kulkas, timbangan elektrik, timbangan analitik, sentrifugator, inkubator, autoklaf, lampu UV, dan Laminar Air Flow (LAF).

Bahan yang diperlukan, antara lain :

1. Bahan yang dibutuhkan untuk isolasi bakteri *Pseudomonas sp.* adalah sampel susu segar dari peternak dan KUD dan media TSA.
2. Bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri *Pseudomonas sp.* adalah media agar (NA nutrien), oksidase stick, pepton water 0,1%, reagen H₂O₂ 3 %, Kaldu MR-VP, media TSIA, medium tripton cair, media Simmon sitrat , bahan-bahan untuk pewarnaan Gram (kristal violet, safranin, acetone alkohol akuades, alkohol 70%, desinfektan.
3. Bahan yang dibutuhkan untuk produksi biosurfaktan adalah minimum media yang berisi limbah tahu, vegetable oil, tetes tebu dan limbah keju (whey), Blood Agar Plate, medium Davis Minimal Broth (DMB), dan minyak.
4. Bahan yang dibutuhkan dalam uji fungsi deteksi mastitis adalah susu mastitis sub klinis dan klinis.

Prosedur Penelitian

1. Isolasi Bakteri *Pseudomonas sp.*

Isolasi diambil dari sampel susu segar. Sampel diambil berupa susu segar yang berasal dari peternak rakyat dan diambil pada pemerahan pukul 05.30 pagi. Pengenceran susu dilakukan dengan media pengenceran Buffer Peptone Water 10 % menggunakan micropipette. Penanaman dilakukan pada pengenceran 10⁻⁴, 10⁻⁵ dan 10⁻⁶ dengan metode pour ke media TSA. Setelah inkubasi pada 300C selama 48 jam, dilakukan penghitungan koloni bakteri dan seleksi bakteri untuk pemurnian (jumlah koloni 25-250). Kemudian dilanjutkan pemurnian ke media TSA dengan metode streak dari koloni biakan pertama. Dilakukan inkubasi pada 300C selama 48 jam dan persiapan pembuatan media TSA miring. Setelah 48 jam, dilakukan streak koloni bakteri single colony ke media TSA miring untuk memperoleh seed culture.

2. Uji Identifikasi Bakteri

Seed culture *Pseudomonas sp.* yang diperoleh dilakukan uji identifikasi dan biokimia, yang terdiri dari pewarnaan Gram, indol, MR-VP, citrate, H₂S, glukosa, sukrosa, laktosa, oksidase dan katalase.

3. Produksi Biosurfaktan

Dilakukan penanaman bakteri pada minimum media yang berisi limbah tahu, vegetable oil, tetes tebu dan limbah keju (whey), dan limbah minyak goreng. Dilakukan dengan 15 kombinasi pada nutrient broth. Penanaman ini menggunakan kadar bahan 0%, 25%, 50%, 75% dan 100% serta dilakukan pada masa inkubasi 28, 48 dan 72 jam dengan 15 kombinasi.

4. Uji Potensi Biosurfaktan berbasis *Pseudomonas sp.*

Blood Haemolysis Test

Fresh culture dari isolat yang sudah murni di-streak pada Blood Agar Plate dan diinkubasi 48-72 jam pada suhu 37oC. Koloni bakteri yang diamati akan terlihat clearing zone di sekitarnya.

Uji Drop Collapse

Setetes suspensi sel ditempatkan pada permukaan yang dilapisi minyak dan dapat diamati langsung kemampuan suspensi sel untuk memecah lapisan permukaan minyak. Hasil positif menunjukkan tetesan yang mengandung biosurfaktan akan hancur, sedangkan tetesan non-surfaktan tetap stabil.

Tegangan Permukaan dengan Metode Cincin Du Nouy

Seleksi bakteri penghasil penghasil biosurfaktan dilakukan menurut metoda Nielsen et al., (2002) dengan cara menumbuhkan isolat terpilih dalam 5 ml medium Davis Minimal Broth (DMB) yang mengandung 2mM laktosa, inkubasi pada suhu 200C selama 2 hari. Aktifitas biosurfaktan dari kultur bakteri dianalisa dengan mengukur tegangan permukaan menggunakan tensiometer Du-Nouy. Selanjutnya isolat yang menunjukkan mampu menurunkan tegangan permukaan akan dipilih sebagai kandidat bakteri sumber biosurfaktan.

5. Uji Fungsi Deteksi Mastitis

Dalam pengujian kandidat bakteri penghasil biosurfaktan, kami akan melakukan simulasi dengan melihat sifat deterjen yang akan dihasilkan oleh kandidat bakteri penghasil biosurfaktan. Simulasi menggunakan metode kocok pada tabung reaksi berisi air. Tabung reaksi (1) berisi air tanpa supernatan sebagai control negatif, tabung reaksi (2) berisi air yang ditambahkan deterjen sintetik sebagai kontrol positif, sedangkan tabung reaksi (3) berisi air yang ditambahkan supernatan bakteri. Perlakuan yang dilakukan dilihat berdasar kekentalan, jenis mastitis (klinis/subklinis) dan konsentrasi biosurfaktan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil isolasi bakteri pada sampel susu segar yang di ambil dari peternakan sapi perah rakyat di daerah Karang Ploso Malang Jawa Timur. Sampel di tanam pada media TSA. hasil yang didapat koloni bakteri yang terpisah dan di dapati 5 koloni bakteri yang berbeda pada setiap pengencerannya. Dari 5 jenis koloni dilakukan pengamatan dibawah

sinar UV dan melihat koloni yang membentuk flouresensi sebagai salah satu ciri spesifik bakteri *Pseudomonas sp.* Kemudian koloni yang membentuk flouresensi di bawah UV langsung di amati di bawah mikroskop dengan cara pewarnaan Gram. Dan di dapati bakteri dengan bentuk basil dengan gram negatif. Setelah diketahui karakteristik morfologi, dilakukan karakterisasi biokimia dari isolat bakteri berdasarkan Manual for the Identification of Medical Bacteria (Barrow & Feltham, 1993) (tabel 1), indol, MR-VP, citrate, H₂S, glukosa, sukrosa, laktosa, oksidase dan katalase.

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia

Uji Biokimia	In d ol	M R	V P	Si tr at	T SI A	G l u k	S u k k	L a k k	O k s	K a t
Ha sil	-	+	-	+	H ₂ S :-	-	-	-	+	+

Ket. : (+) menunjukkan hasil positif dan (-) menunjukkan hasil negatif

Hasil semua uji tersebut dan dibandingkan dengan literatur yang ada bahwa bakteri yang di dapatkan adalah *Pseudomonas sp.* yang kemudian bakteri tersebut diisolasi dan dimurnikan sehingga di peroleh isolat murni *Pseudomonas sp.* Penelitian ini didasari dari penggunaan surfaktan sintetik sebagai bahan dasar utama untuk menguji mastitis. Dalam penggunaan surfaktan sintetik dapat berbahaya bagi makhluk hidup yang ada di sekitarnya karena sifatnya yang susah di degradasi oleh lingkungan dan mikroba lainnya. Surfaktan atau deterjen ini dapat menyebabkan rusaknya membran sel dan inti sel, melalui ikatan yang dibentuk melalui sisi hidrofobik deterjen dengan protein dan lemak pada membran, membentuk senyawa "lipid protein-deterjen kompleks". Senyawa tersebut dapat terbentuk karena protein dan lipid memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik, demikian juga dengan deterjen, sehingga dapat membentuk suatu ikatan kimia. Rusaknya membran sel menyebabkan

keluarnya DNA dari inti sel kemudian surfaktan akan mendenaturasi histon yang mengikat DNA menyebabkan viskositas susu/DNA/surfaktan meningkat sehingga susu akan terlihat lebih kental (Xia, 2006). konsentrasi dari surfaktan memiliki peranan penting dalam proses lisis membran. Lisis membran hanya akan terjadi bila konsentrasi surfaktan cukup tinggi. Berdasarkan cara kerja surfaktan tersebut penelitian ini dilakukan.

Hasil penanaman isolat bakteri *Pseudomonas sp* pada 4 media yaitu limbah tahu (25%; 50%; 75%; 100%), limbah keju (25%; 50%; 75%; 100%), vegetable oil (25%; 50%; 75%; 100%) dan minyak goreng (25%; 50%; 75%; 100%) dengan waktu 24, 48 dan 72 jam setelah dilakukan uji drops collapse, blood agar plate dan cincin du Nuoy menunjukkan bahwa media yang paling efektif menghasilkan biosurfaktan asal *Pseudomonas sp*. adalah pada media vegetable oil 25% dengan waktu inkubasi selama 24 jam (Tabel 2 dan tabel 3).

Tabel 2. Hasil Uji Aktifitas Biosurfaktan Pada Minimum Media Yang Digunakan

NO	Minimum Media	24 Jam	48 Jam	72 Jam
		Drops Collapse	Drops Collapse	Drops Collapse
1	Limbah Tahu			
	25%	-	-	-
	50%	-	-	-
	75%	-	-	-
	100%	-	-	-
2	Limbah Keju			
	25%	-	-	-
	50%	-	-	-
	75%	-	-	-
	100%	-	-	-
3	Vegetable Oil			
	25%	+	+	-
	50%	+	+	-
	75%	-	-	-
	100%	-	-	-
4	Minyak Goreng			
	25%			

	50%			
	75%			
	100%			

Keterangan : (+) menyebar dipermukaan dan (-) tidak menyebar dipermukaan

Tabel 3. Hasil uji BAP dan Cincin Du Nuoy

NO	Minimum Media	24 Jam	48 Jam
		BAP	Cincin Du Nuoy
1	Vegetable oil		
	25%	+	+
	50%	-	-

Keterangan : BAP : (+) zona bening dipermukaan dan (-) tidak ada zona bening di permukaan

Cincin Du Nuoy : (+) menyebar dipermukaan dan (-) tidak menyebar di permukaan

Hasil uji aktivitas biosurfaktan menunjukkan bahwa hasil biosurfaktan yang terbaik yaitu pada media vegetable Oil 25%. Setelah diketahui hasil terbaik yaitu supernatan/biosurfaktan yang berasal dari media vegetable Oil maka langsung dilakukan uji terhadap susu yang terkena mastitis, dan membandingkannya dengan Reagen pabrikan yang sudah sering digunakan peternak sapi perah yaitu Carlifornia Mastitis Test. Pada uji CMT (California Mastitis Test) menggunakan dosis 1:1 antara Reagen dengan susu, kemudian untuk Reagen biosurfaktan dicobakan dengan dosis 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, sampai terbentuk reaksi yang sama dengan Reagen CMT terhadap susu. Pada biosurfaktan susu yang di gunakan adalah sebanyak 2 ml per sekali uji. Hasil uji biosurfaktan (MASTECH) terhadap susu mastitis dan normal di lihat dari viskositas yang terlihat (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil Uji Dosis Biosurfaktan Terhadap Susu Di Bandingkan dengan Uji CMT 1:1

NO	Dosis Biosurfaktan (MASTECH)	Susu Normal	Susu Mastitis
1	0,1 ml	+++	-

2	0,2 ml	+++	+
3	0,3 ml	+++	+
4	0,4 ml	+++	+++

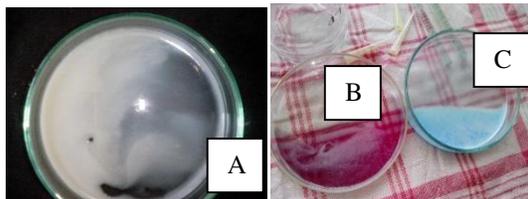
Keterangan : (-) : sampel susu dengan biosurfaktan tidak sama dengan menggunakan CMT

(+) : sampel susu dengan biosurfaktan hampir sama dengan menggunakan CMT

(++) : sampel susu dengan biosurfaktan mendekati sama dengan menggunakan CMT

(+++): sampel susu dengan biosurfaktan sangat mirip dengan menggunakan CMT

Dari tabel diatas diatas maka dosis yang digunakan untuk mendeteksi mastitis adalah 0,4 ml untuk 2 ml susu atau dengan perbandingan 0,4:2 (gambar 1). Terbukti penggunaan biosurfaktan terbukti lebih aman dan ramah lingkungan karena sifatnya yang mudah di degradasi oleh lingkungan dan beberapa mikroba.



Gambar 1. (A). Susu mastitis + biosurfaktan 0,4 ml, (B). Susu matitis + Reagan CMT 2ml, (C). Susu mastitis + biosurfaktan 0,4ml + methylen blue 0,1 ml.

4. KESIMPULAN

Pseudomonas sp yang berasal dari susu segar mampu menghasilkan biosurfaktan. Biosurfaktan mampu bereaksi dengan susu mastitis dengan terbentuknya viskositas. Biosurfaktan mampu di jadikan sebagai deteksi mastitis pada sapi perah.

5. REFERENSI

Anandaraj, B and P.Thivakaran. 2010. Isolation and Production of Biosurfactant Producing Organism from Oil Spilled Soil. Journal Bioscient Technology, vol 1 (3),2010,120-126 p.g. Department of

Microbiology, Thanthai Hans Roever College, Peramabalur – 621 212. Tamilnadu., India.

Andrews, A.H. 2000. The Health of Dairy Cattle. Blackwell Publishing. USA.

Blood, D.C. and J.A. Henderson. 2007. Disease Associated with Bacteria. In : E. H. Marth and J.L Steele. Veterinary Medicine. A Textbook of the Disease Bailliere Tindall, London

Barrow dan Feltham. 1993. Manual for identification of medical bacteria. 3rd Edn. Cambridge University Press, Cambridge, London.

Dodd, F.H. and J.M. Booth. 2001. Mastitis and Milk Production. In : E. H. Marth and J.LSteele. Applied Dairy Microbiology.2nd ed. Marcell Dekker Inc. USA.

[IDF] International Dairy Federation. 1999. Suggested interpretation of mastitis terminology. Bull Int Dairy Fed 33: 3-26.

Lay, B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Edisi pertama. P.T. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Morin, D.E. and W.L. Hurley. 2003. Mastitis Lesson B. University of Illinois, USA

Parra, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles and M. P. Bosch. 1989. Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactant. J. Am. Oil Chem. Soc. 66: 141-145.

Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly and F.C. Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd. UK. 63.

Roosena, Yusuf. 2010. Kandungan protein susu sapi perah friesian holstein akibat pemberian pakan yang mengandung tepung katul (Sauropus androgynus (L.) Merr) YANG BERBEDA. Samarinda: Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman

Subronto. 2003. Ilmu Penyakit Ternak (Mamalia) I. Edisi Kedua. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Sudarwanto M. 1999. Usaha peningkatan produksi susu melalui program

- pengendalian mastitis subklinis. Di dalam: Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Masyarakat Veteriner; Bogor, 22 Mei 1999. Bogor: FKH IPB.
- Sudono, A. Rosdiana, F. R, Setiawan, R. S. 2003. Beternak Sapi Perah Secara Intensif. AgroMedia Pustaka. Jakarta
- Xia, Stephen S. 2006. The rheology of gel formed during the California Mastitis Test. The University of Waikato