

DETEKSI *Mycobacterium avium* SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS PADA SUSU FORMULA LANJUTAN DI BOGOR¹⁾

(Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Growing up Milk Formula in Bogor)

Widagdo Sri Nugroho, Mirnawati Sudarwanto²⁾,
Denny Widaya Lukman²⁾, Surachmi Setyaningsih²⁾,
Rochman Naim²⁾, dan Ewald Usleber^{2,3)}

ABSTRACT

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) becomes a public health concern in developed countries which associated with Crohn's disease (CD) in human and Johne's disease (JD) in ruminants. Some researchers in Europe, USA, and Australia detected MAP in the dairy products and showed the relationship among MAP, CD, and JD. Meanwhile Indonesia imported milk and milk products from those countries to cover national demand. In the future it will be a potential problem to national dairy herd and human health. The aim of this study is to detect MAP in the growing up milk formula. Fifty samples from five established distributors were taken in Bogor. Some diagnostic methods were used parallel in this study, namely Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT), Herrold's Egg Yolk enrichment with mycobactine-J (HEYM) and polymerase chain reaction method (PCR) with insertion sequence IS 900 and F 57 as primer. Neither MAP grew up in MGIT and HEYM after 20 weeks of incubation period. No positive samples were found by conventional PCR using IS 900 and F57 either but 5 samples were detected positive by nested PCR F57. Although there was no evidence of MAP grew from the samples in this study, the comprehensive and sustainable studies on MAP still should be carried out with more and varied samples, as well as in human to provide data on MAP and to anticipate it in Indonesia.

Key words: mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, growing up milk formula, PCR

PENDAHULUAN

Infeksi *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) menjadi perhatian kesehatan masyarakat di Eropa dan Amerika. Bakteri ini berimplikasi pada kasus peradangan usus granuloma pada manusia yang dikenal sebagai *Crohn's disease* (CD) (Chiodini, 1989; Bull *et al.*, 2003). Tampilan peradangan ini memiliki banyak kemiripan dengan *Johne's disease* (JD) pada ruminansia yang terinfeksi MAP (Harris dan Barletta, 2001).

¹⁾ Bagian dari disertasi penulis pertama, Program Studi Sain Veteriner Sekolah Pascasarjana IPB

²⁾ Berturut-turut Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing

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

Kedua penyakit tersebut berpengaruh pada ekonomi dan kesehatan manusia seperti yang dilaporkan *Europe Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* bahwa di Swedia biaya pengobatan kasus CD pada tahun 1994 mencapai 4 juta € dan tingkat kejadian penyakit ini di Eropa mencapai 5.6 kasus per 100 000 orang per tahun (SCAHAW, 2000). Di sisi lain JD menimbulkan kerugian pada peternakan sapi perah di Amerika Serikat hingga \$ 1.5 miliar pada tahun 1998 dan peternakan-peternakan yang mengalami kasus tersebut meningkat hingga 70% di beberapa negara Eropa, AS, dan Kanada (Stabel, 1998).

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis termasuk bakteri dalam keluarga *Mycobacteriaceae*, spesies *Mycobacterium avium complex* (Harris dan Barletta, 2001). Mikroba ini merupakan bakteri yang dapat ditemui di alam, tergolong Gram positif, berbentuk batang dengan ukuran $0.2-0.7 \times 1-10 \mu\text{m}$, nonmotil, tahan asam dan alkohol, suhu pertumbuhan $25-45^{\circ}\text{C}$ dan optimal pada suhu 39°C , tumbuh lambat 4-24 minggu (SCAHAW, 2000; Sung dan Collins 2003)., membutuhkan *mycobactin J*, yaitu senyawa hidroksimat pengikat besi, mampu tumbuh pada konsentrasi garam $<5\%$ pada pH 5.5 atau lebih (Griffiths, 2003). Bakteri ini mampu bertahan dalam sel makrofag dan menjadi patogen intraseluler yang menyerang sel epitel sapi dan hewan mammalia lainnya serta mampu bertahan pada suhu tinggi yang merupakan faktor penting terkait dengan peran MAP dalam penyebaran penyakit melalui makanan (*foodborne disease*) (Bannantine dan Stabel, 2002).

Kemungkinan keterkaitan antara MAP, JD, dan CD memacu para peneliti untuk menggali informasi dalam rangka memahami dan mengantisipasi permasalahan ini. Hewan penderita JD meskipun dalam kondisi subklinis, dilaporkan dapat mengeluarkan MAP melalui susu sehingga hal ini memungkinkan menjadi media penularan MAP ke manusia. Cara penularan ini menjadi perhatian serius meskipun belum ada bukti-bukti yang disepakati untuk mengaitkan bakteri ini dengan CD (Hermon-Taylor dan Bull, 2002). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa MAP ditemukan pada produk pasturisasi, keju, dan susu formula instan di Irlandia, Amerika, Republik Ceko (Grant *et al.*, 2002; Stabel, 1998; O'Reilly *et al.*, 2004; Donaghy *et al.*, 2004; Hruska *et al.*, 2005; Ikonomopoulos *et al.*, 2005), bahkan di Australia MAP dapat terdeteksi dalam air susu ibu (Whittington *et al.*, 2000) sehingga fakta-fakta ini memperkuat dugaan penularan bakteri tersebut pada manusia dapat terjadi melalui makanan (Chamberlin *et al.*, 2001).

Semua fakta di atas memperlihatkan kejadian infeksi/cemaran MAP di negara-negara Eropa, Amerika, dan Australia yang menjadi pemasok bahan baku susu formula ke Indonesia. Hal ini menempatkan masyarakat Indonesia pada kondisi yang beresiko terinfeksi MAP. Bayi dan anak-anak merupakan target utama konsumen industri susu sehingga resiko keterpaparan anak-anak oleh bakteri MAP sangat besar. Gejala penyakit akibat infeksi MAP tidak segera terlihat karena patogenesis penyakit ini yang berlangsung lambat. Gejala klinis baru akan terespresi pada saat anak-anak tersebut menginjak usia remaja atau dewasa yang merupakan usia produktif. Ekspresi penyakit yang demikian akan menimbulkan kerugian, yaitu gangguan kesehatan dan kerugian ekonomi karena turunnya produktivitas sumber daya manusia.

Deteksi adanya bakteri MAP pada produk pangan khususnya susu formula lanjutan belum pernah dilakukan di Indonesia sehingga penelitian ini bertujuan mendeteksi MAP pada susu formula lanjutan yang dijual di pasar swalayan Bogor.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan Sampel

Lima puluh kotak susu formula (120-200g/kotak) dikumpulkan selama bulan Agustus 2006. Sampel berupa susu formula lanjutan yang diperuntukkan bagi bayi usia 6 bulan sampai 2 tahun, diproduksi oleh 5 produsen yang berbeda. Seluruh sampel dibeli di pasar swalayan di wilayah Bogor. Pengujian sampel dilakukan di laboratorium kesehatan susu Universitas Justus Liebig, Jerman.

Penyiapan sampel

Duapuluh gram dari masing-masing sampel dilarutkan dalam 100 ml aquades steril dan dihomogenkan. Seluruh larutan setiap sampel kemudian dituang ke dalam 2 buah tabung gelas sentrifus steril (ukuran 50 ml) dan disentrifus (Hereaeus Multifuge 3-SR Centrifuge, Kendro Laboratory Products, Osterode Germany) pada kecepatan 2500 x g selama 15 menit pada suhu 4°C. Fraksi krim dan *whey* dibuang, sedangkan pelet pada masing-masing tabung diresuspensi dengan 1 ml aquades steril dan selanjutnya disatukan (dari asal sampel yang sama) dan diaduk hingga rata, 1 ml larutan diambil dan ditempatkan pada tabung ependorf 1,5 ml untuk analisis PCR, sedangkan sisanya digunakan untuk analisis biakan.

Isolasi MAP dengan Media *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT) dan Herrold's Egg Yolk Medium Diperkaya Mycobactin J (HEYM)

Inokulasi

Satu ml suspensi seperti dijelaskan di atas dipindahkan ke dalam tabung gelas steril dan ditambahkan 10 ml 0.75% *hexadecylpyridinium chloride* (HPC) dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 jam. Suspensi disentrifus pada kecepatan 2500 x g selama 15 menit, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1250 µl PBS steril yang mengandung 0.05% *Tween-20* (PBS-T) (Sigma, Steinheim, Germany). Masing-masing sebanyak 250 µl diinokulasikan ke dalam 2 tabung MGIT dan 3 tabung HEYM diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 minggu untuk mendeteksi adanya pertumbuhan bakteri dalam media. Pengamatan dilakukan setiap minggu mulai 4 minggu pertama menggunakan transluminator/sinar ultra violet (UV). Semua koloni terduga positif pada media MGIT atau HEYM dibuat preparat ulas dan diwarnai dengan *Ziehl-Neelsen acid fast stain* (Becton Dickinson) untuk konfirmasi spesies.

Deteksi MAP dengan Analisis PCR

Ekstraksi DNA

Sebanyak 500 µl suspensi yang diperoleh dari tahap di atas, dipindahkan ke dalam tabung ependorf 2 ml dan disentrifus pada kecepatan 10.000 x g selama 30 menit. Supernatan dibuang dan 400 µl larutan penyangga TE *lysis* ditambahkan pada pelet dan divortek hingga homogen. Selanjutnya, suspensi dimasukkan ke dalam freezer -80°C selama 5 menit dan segera dipindahkan ke dalam penangas air suhu 95°C selama 1 menit, tahap ini diulang satu kali kemudian suspensi diinkubasi di dalam penangas air suhu 80°C selama 20 menit. Selanjutnya,

suspensi didinginkan pada suhu 4°C dan kemudian ditambahkan 35 µl proteinase K dan 400 µl AL *Lysis buffer* (Qiagen, Hilden, Germany), kocok rata dengan vortek dan diinkubasi pada suhu 56°C selama satu malam. Pada tahap selanjutnya suspensi diekstraksi menggunakan DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai petunjuk dari perusahaan.

Amplifikasi DNA

Metode PCR dengan primer spesifik F57 dilakukan dengan menggunakan primer oligonukletotida F57/R57 dan dilanjutkan dengan PCR *nested* dengan primer F57 and F57Rn seperti dijelaskan oleh Vansnick *et al.* (2004). Metode PCR dengan primer spesifik IS 900 menggunakan primer oligonukleotida TJ1/TJ2 (Bull *et al.*, 2003). Amplifikasi PCR dilakukan dengan menformulasikan 50 µl larutan reaksi yang tersusun dari 1.5 µl masing-masing primers (10 pmol/µl); 1.5 µl dNTP-mix (10 mmol) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany); 5 µl GeneAmp 10x PCR Gold Buffer (150 mM Tris-HCL, 500 mM KCL; pH 8.0) (Applied Biosystem, Darmstadt, Germany); 3.0 µl MgCl₂ (25 mM) (Applied Biosystem); 0.35 µl AmpliTaq Gold[®] polymerase (5 U/µl, Applied Biosystem), 32,15 µl aquades steril; ditambahkan 5.0 µl DNA template. Kondisi amplifikasi PCR F57 putaran pertama yang digunakan adalah 1 siklus pada suhu 94°C selama 10 menit kemudian 40 siklus pada suhu 94°C selama 1 menit, 58°C selama 1 menit, dan 72°C selama 3 menit, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada suhu 72°C selama 7 menit. Pada putaran kedua digunakan 1 siklus dengan suhu 94°C selama 10 menit kemudian 30 siklus pada suhu 94°C selama 1 menit, suhu 58°C selama 1 menit, dan suhu 72°C selama 3 menit, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada suhu 72°C selama 7 menit. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR iCycler-Biorad thermocycler (Biorad, Munich, Germany).

Produk PCR (13 µl) dicampur dengan 2 µl *loading dye solution* (MBI Fermentas) dan sebagai marker digunakan 100 bp DNA ladder atau *mid range* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) selanjutnya diseparasi menggunakan 2% gel agarose elektroforesis (Biozym, Hessisch-Oldendorf, 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, gel agarose direndam dalam larutan pewarna *ethidium bromide* 5 µl/ml (Sigma, Taufkirchen, Germany) selama 5 menit, dan gambar didokumentasikan dengan menggunakan UV (245 nm) trans-illuminator (Biorad).

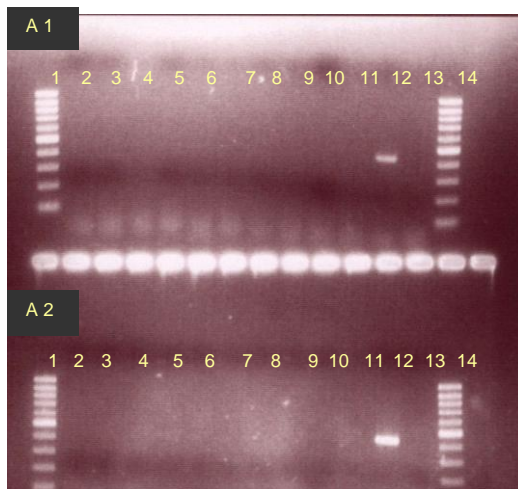
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap sampel yang telah diinokulasikan ke dalam MGIT dan HEYM yang diinkubasi selama 20 minggu memperlihatkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *MAP*. Hal tersebut terlihat dengan tidak adanya media MGIT yang berpendar dalam tabung dan pertumbuhan koloni pada HEYM. Hasil analisis PCR konvensional menggunakan primer IS 900 dan F57 menunjukkan tidak adanya pita DNA *MAP* dari semua sampel yang diperiksa, tetapi dengan analisis PCR F 57 *nested* diperoleh pita spesifik DNA *MAP* dari 5 sampel yang berasal dari beberapa produsen. Hasil analisis secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis MAP dengan berbagai metode pada susu formula lanjutan

Produsen (jumlah sampel)	Metode uji									
	HEYM		MGIT		PCR IS 900		PCR F57		PCR F57 <i>nested</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 (10)	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
2 (10)	0	10	0	10	0	10	0	10	2	8
3 (10)	0	10	0	10	0	10	0	10	1	9
4 (10)	0	10	0	10	0	10	0	10	2	8
5 (10)	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Total (50)	0	50	0	50	0	50	0	50	5	45

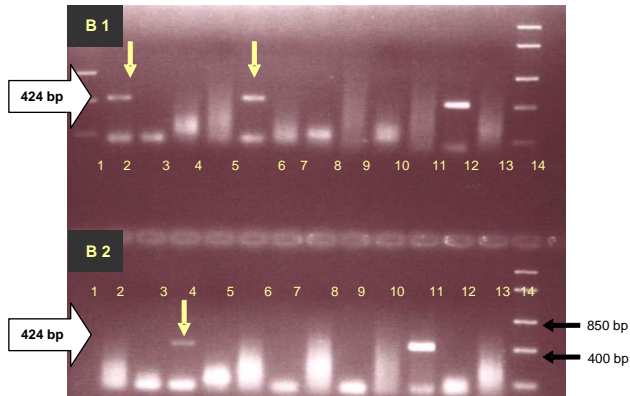
Gambar 1 memperlihatkan hasil PCR F57 konvensional. Kolom 1 dan 14 merupakan marker DNA ladder 100 bp, sedangkan kolom 12 dan 13 masing-masing adalah kontrol positif dan negatif. Tidak terlihat adanya pita DNA pada analisis PCR konvensional. Gambar 2 adalah hasil PCR F57 *nested*, pada gambar B1 kolom 2 dan 6 serta gambar B2 kolom 4 menunjukkan pita DNA target dari sampel susu formula lanjutan. Hasil ini menunjukkan adanya jejak keberadaan bakteri MAP pada sampel susu formula yang bersangkutan.



Gambar 1. Hasil PCR F57 konvensional, tidak ada pita DNA dari sampel, kolom 12 kontrol positif, kolom 1 dan 14 marker bp 100 ladder

Crohn's disease adalah penyakit infeksi saluran pencernaan bagian bawah dengan penyebab multifaktor yang melibatkan kepekaan genetik, pemicu lingkungan yang kurang jelas, dan kelukaan jaringan yang merangsang kekebalan (Chamberlin *et al.*, 2001). Di kalangan ilmu kedokteran dikenal adanya tiga teori penyebab CD, yaitu teori autoimun, teori kelemahan sistem kekebalan, dan teori mikroba. Meskipun teori autoimun merupakan materi publikasi yang paling sering dirujuk sebagai penyebab CD pada saat ini (Chamberlin dan Naser, 2006), banyak peneliti dan publikasi yang menghubungkan kasus CD dengan MAP sejak ditemukannya bakteri tersebut pada penderita CD oleh Dalziel pada tahun 1913 (SCAHAW, 2000). Hermon-Taylor *et al.* (1998) mengidentifikasi MAP dengan PCR

IS 900 dari kelenjar limfa leher seorang anak umur 7 tahun penderita *scrofula* dan 5 tahun kemudian menunjukkan tanda-tanda khas penderita CD. Whittington *et al.* (2000) mendapatkan MAP strain sapi yang berasal dari penderita CD di Australia, sementara Naser *et al.* (2000) dengan menggunakan metode PCR mendeteksi MAP pada air susu ibu dari 2 penderita CD dan tidak menemukannya dari 5 orang ibu yang sehat. Data tersebut menunjukkan bukti yang sangat berarti mengenai peran bakteri MAP pada kasus CD.



Gambar 2. Hasil PCR F57 *nested*, pita DNA MAP terlihat pada gambar B1 kolom 2 dan 6 dan gambar B2 kolom 4 marker DNA mid range (kolom 1 dan 14)

Kasus infeksi MAP pada manusia seringkali dikaitkan dengan produk pangan asal hewan, khususnya susu dan hasil olahannya. Beberapa penelitian memperlihatkan hal tersebut seperti yang dilaporkan Millar *et al.* (1996) yang menyebutkan 7% susu pasturisasi yang dijual di pasar swalayan di Inggris dan Wales terdeteksi mengandung MAP. Komite penasehat keamanan pangan Eropa juga melaporkan bahwa di Inggris bakteri tersebut terdeteksi pada susu segar sebanyak 2%, pada susu pasturisasi 2.1%, dan 1.4% pada susu skim (Griffiths, 2003). Banyak hasil survei lainnya yang memperlihatkan keberadaan MAP pada susu olahan meskipun sudah melalui proses pemanasan.

Grant *et al.* (1996) menguji daya tahan MAP terhadap panas dengan melakukan kajian terhadap susu yang telah dikontaminasi MAP dengan dosis 10^4 - 10^7 cfu/ml. Pasturisasi dilakukan dengan metode *high temperature short time* (HTST) dan *low temperature long time* (LTLT). Hasil uji menunjukkan bahwa pasturisasi mampu mengurangi 4-50% bakteri, ini membuktikan bahwa MAP mampu bertahan dalam lingkungan yang panas. Daya tahan MAP terhadap panas ini oleh Sung *et al.* (2004) diduga karena peran 3 protein, yaitu *GroES heat shock protein*, *antigen 85 complex B*, dan *alpha antigen*. Informasi inilah yang sampai saat ini dapat menjelaskan beberapa penelitian yang masih menemukan adanya MAP pada beberapa produk susu olahan seperti susu pasturisasi dan susu instan formula.

Metode diagnosis MAP menggunakan PCR dapat meningkatkan kepekaan diagnosis, khususnya untuk pemeriksaan susu dan produk olahannya. Berdasarkan metode PCR dan isolasi bakteri dapat terdeteksi MAP pada susu pasturisasi di United Kingdom (Grant *et al.*, 2002), di Irlandia pada susu segar dan pasturisasi (O'Reilly *et al.*, 2004) dan pada keju *cheddar* (Donaghy *et al.*, 2004).

Penggunaan sekuen IS 900 sebagai primer MAP dilaporkan oleh Vary *et al.* yang diacu Harris dan Barletta, (2001) diketahui meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas diagnosis PCR terhadap MAP bahkan dapat membedakannya dengan subspecies lain dari *M. avium* complex dan *M. silvaticum*. Bull *et al.* (2003) memperlihatkan sekuen IS 900 (primer TJ1-4) memiliki tingkat akurasi yang cukup tinggi, tetapi beberapa peneliti masih mendapatkan beberapa hasil positif palsu sehingga pengembangan primer untuk meningkatkan ketepatan diagnosis primer IS 900 terhadap bakteri MAP tetap dilakukan. Primer F57 merupakan satu hasil pengembangan dari sekuen yang sudah ada dan pada skala laboratorium menunjukkan kinerja yang sangat baik dengan sensitivitas uji yang mampu mendeteksi MAP hingga 1 CFU, tetapi untuk menguatkan hasil perlu dilakukan simulasi program PCR agar spesifisitasnya juga tinggi (Vansnick *et al.*, 2004). Tasara dan Stephan (2005) menguji primer ini dengan metode *real-time* PCR dan mampu mendeteksi MAP di dalam susu yang di kontaminasi dengan MAP sebanyak 10 sel/ml. Metode ini direkomendasikan untuk digunakan sebagai metode rutin pengujian MAP pada susu dan akan lebih akurat jika diparalel dengan penggunaan primer IS 900.

Penelitian ini tidak menemukan pertumbuhan bakteri MAP pada media MGIT dan HEYM akan tetapi dengan uji PCR F57 *nested* dapat ditemukan pita DNA MAP dari 5 sampel susu formula lanjutan. Hasil ini sedikit berbeda dengan temuan di Republik Cseka yang menguji 51 sampel susu formula bayi dan terdeteksi 25 sampel yang mengandung MAP berdasarkan PCR menggunakan primer IS 900, sedangkan hasil pengujian dengan primer F57 diperoleh 18 sampel yang positif (Hruska *et al.*, 2005). Munculnya pita pada hasil PCR *nested* dalam penelitian ini memperlihatkan adanya fragmen DNA target. Keberadaan fragmen DNA ini membuktikan adanya jejak bakteri MAP pada sampel tersebut. Dapat dipahami bahwa bakteri MAP yang mencemari produk susu formula lanjutan tersebut dalam kondisi mati atau keberadaan bakteri sangat sedikit dan tidak dapat berkembang yang terbukti dengan tidak tumbuhnya bakteri pada media MGIT dan HEYM. Adanya jejak MAP dalam sampel susu formula lanjutan yang diuji dalam penelitian ini merupakan tanda awal yang sangat berarti bagi industri susu nasional untuk meningkatkan kualitas keamanan produk mereka.

Hasil PCR F57 *nested* kajian ini memiliki arti yang sama dengan hasil uji serologis tiga ekor sapi perah di Jawa Barat yang dilaporkan pada tahun 2004 (Adji, 2004) dan pada tahun 2007 ditemukan kembali 6 ekor seropositif dari kelompok sapi perah di Jawa Tengah (hasil survei Balai Besar Veteriner Bogor tahun 2007, belum dipublikasi). Kedua data di atas walaupun tidak dapat dikaitkan secara langsung namun memberikan informasi dini bahwa masalah MAP di bidang usaha sapi perah, susu dan hasil olahannya adalah nyata dan sangat potensial berkembang di Indonesia.

Kajian lanjut secara komprehensif terhadap keberadaan MAP baik dari aspek kesehatan hewan dan ekonomi peternakan, keamanan pangan serta kesehatan manusia harus dilakukan dalam rangka menjamin kesehatan dan kesejahteraan masyarakat. Kajian lanjutan dapat dilakukan dengan mendeteksi/mengisolasi MAP dari hewan, produk pangan asal hewan seperti susu dan olahannya dengan memperbesar jumlah dan variasi jenis sampel seperti jenis komoditas, spesies hewan, lingkungan peternakan, dan pabrik pengolahan, serta karyawan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tidak ditemukan pertumbuhan *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) dari susu formula lanjutan di wilayah Bogor meskipun ada indikasi keberadaan bakteri MAP di dalamnya.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* harus dilakukan untuk memperoleh data yang lengkap dan komprehensif mengenai MAP di Indonesia dalam rangka mengantisipasi permasalahan ini di masa mendatang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang membiayai pendidikan pascasarjana bagi penulis pertama serta kepada *Deutsche Akademische Austauschdienst* (DAAD) yang telah membantu membiayai penelitian ini melalui program *sandwich*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, R.S. 2004. Isolasi dan uji serologi terhadap *Mycobacterium paratuberculosis* pada sapi perah. Di dalam: *Iptek Sebagai Motor Penggerak Pembangunan Sistem dan usaha Agribisnis Peternakan*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner; Bogor, 4-5 Agustus 2004. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian, hlm 281-284.
- Bannantine, J.P. and Stabel, J.R. 2002. Killing of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* within macrophages. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2> [15 Juli 2005].
- Bull, T.J., *et al.* 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.
- Chamberlin W *et al.* 2001. Review article: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* as one cause of Crohn's diseases. *Aliment Pharmacol. Ther.* 15: 337-346.
- Chamberlin, W.M., and Naser, S.A. 2006. Integrating theories of the etiology of Chron's disease on the etiology of crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med. Sci. Monit* 12:RA27-33.

- Chiodini, R.J. 1989. Crohn's disease and the Mycobacterioses: review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Review.* 2: 90-177
- Donaghy, J.A., Totton, N.L., and Rowe, M.T. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 8:4899-4905.
- Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D., and Rowe, M.T. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:631-636.
- Grant, I.R., Ball, H.J., and Rowe, M.T. 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: Blackburn CW. & McClure PJ, editor. *Food-borne Pathogenes*, Ed ke-1. North America: Woodhead and CRC Pr. hlm 489-500.
- Harris, N.B. and Barletta, R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489-512.
- Hermon-Taylor, J., Barnes, N., Clarke, C., and Finlayson, C. 1998. Grand Round: *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *BMJ*:316:449-453.
- Hermon-Taylor, J. and Bull, T.J. 2002. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J.Med. Microbiol.* 51: 3-6.
- Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P., and Pavlik, I. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: Paratuberculosis in cattle-the public health problem to be solved. *Vet. Med. Czech.* 50. 8: 327-335.
- Ikonomopoulos, *et al.* 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:8934-8936.
- Millar D *et al.* 1996. IS 900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurised cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3446-3452.
- Naser, S.A., Schwartz, D., and Shafran. I. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients, *Am. J. Gastro.* 4:1094-095.
- O'Reilly, C.E *et al.* 2004. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine

the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5138-5144.

[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.

Stabel, J.R. 1998. Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy. Sci.* 81:283-288.

Sung, N. and Collins, M.T. 2003. Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6833-6840.

Sung, N., Takayama, K., and Collins, M.T. 2004. Possible association of GroES and antigen 85 protein with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1688-1697.

Tasara, T. and Stephan, R. 2005. Development of an F 57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:5957-5968.

Vansnick E *et al.* 2004. Newly developed primers for detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100:197-204.

Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., and Marsh, I. 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38:3240-3248.