

BAB III

MATERI DAN METODE

III.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama satu bulan , mulai tanggal 20 Pebruari sampai dengan 20 Maret 1997. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Fakultas Kedokteran Hewan , Universitas Airlangga.

III.2. Materi Penelitian

III.2.1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah 40 sampel usapan dengan perincian : 10 usapan pernafasan atas, 10 usapan mukosa vagina diperoleh dari peternakan babi di daerah Mojokerto dan 10 usapan pernafasan atas, 10 usapan mukosa vagina yang diperoleh dari babi pada Rumah Potong Hewan , Pegirikan - Surabaya serta tiga buah kultur standar *S. suis* dengan kode : RSS₂, P₃.R, P₃.Ae , yang digunakan sebagai kontrol diperoleh dari Prof. Dr. Ch. Laemmler, Laboratorium Bakteriologi dan Immunologi Universitas Justus-Liebig, Giessen-Jerman yang merupakan koleksi Laboratorium VPH Fakultas Kedokteran Hewan, UNAIR.

III.2.2. Bahan penelitian

Mueller Hinton Agar (MHA), media agar darah merah domba, gula-gula, Amilum, lugol, Cakram Optochin, Voges Proskauer (VP), Todd Hewit Broth (THB) yang mengandung 6,5 % NaCl, Na Hippurat, bahan pewarnaan Gram, alkohol 96%, Methyl Red, reagen Kovac, H₂O₂ 2%, media transport glycerin, minyak emersi.

III.2.3. Alat Penelitian

Ose jarum isolat, ose, tabung reaksi, pipet, cawan petri, pembakar bunsen, mikroskop, gelas obyek, gelas penutup, inkubator, oksikator vakum, cotton swab steril, timbangan neraca.

III.3. Metode Penelitian

III.3.1. Pengambilan Sampel

Empat puluh sampel lendir babi diambil secara acak dari peternakan babi dan Rumah Potong Hewan, pada daerah saluran pernafasan atas dan mukosa vagina. Pengambilan dengan cotton swab steril dengan cara mengusap pada permukaan daerah pernafasan atas dan mukosa vagina. Sampel yang terambil dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi media transport, glycerin, kemudian di simpan dalam termos es dan segera dibawa ke Laboratorium Bakteri dan Mikologi Fakultas Kedokteran

Hewan, Universitas Airlangga untuk diadakan pemeriksaan identifikasi *S. suis* lebih lanjut.

III.3.2. Pemupukan

Pemupukan pada media agar darah dibuat dari media agar dasar dengan 5% darah merah domba yang sudah didefibrinisasi . Pemupukan dilakukan dengan jalan sampel digoreskan dengan menggunakan ose pada permukaan Agar darah merah domba. Diinkubasi selama 24 - 48 jam pada temperatur 37° C secara aerob dan secara mikroaerofilik dalam oksikator vakum (De Moor, 1963; Hommez, 1986; Tarradas, 1994; Estoepangestie, 1996).

III.3.3. Uji Katalase

Setelah isolat tumbuh baik dilakukan uji katalase untuk melihat apakah kuman mampu mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Caranya pada alas gelas bebas minyak ditetaskan H_2O_2 2% , koloni kuman diambil dengan ose dan segera dicampurkan dengan H_2O_2 2%. Bila bakteri yang bersifat katalase positif maka akan timbul gelembung udara, sebaliknya bila bakteri bersifat katalase negatif tidak timbul gelembung udara (Pelczar dan Chan, 1986; Estoepangestie, 1996).

III.3.4. Pemeriksaan Mikroskopis

III.3.4.1. Preparat natif

Sampel diambil dengan ose dan diletakkan di atas gelas alas gantung, lalu ditutup dengan gelas penutup kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pemeriksaan 1000 kali, untuk dilihat bentuk kuman dan motilitas kuman (Pelczar dan Chan, 1986; Singleton, 1992).

III.3.4.2. Pewarnaan Gram

Dengan cara membuat preparat ulas kemudian difiksasi di atas nyala api. Preparat ulas tersebut lalu diwarnai dengan Gentian violet selama 3 menit, kemudian ditetesi dengan lugol dan dilunturkan dengan alkohol 96 %. Selanjutnya dicuci dengan air kran, lalu diwarnai dengan saffranin selama 3 menit, kemudian dicuci kembali dengan air kran dan dikeringkan. Sediaan tersebut lalu diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Bakteri yang bersifat gram positif tampak berwarna ungu atau violet, sedangkan bakteri yang bersifat gram negatif akan berwarna merah (Frobisher, 1962; Pelczar dan Chan, 1986).

III.3.5. Uji Cakram Optochin

Tujuan membedakan kuman *Streptococcus* dan *Diplococcus* berdasarkan ada tidaknya zona di sekitar cakram optochin. Uji cakram optochin dilakukan dengan jalan mempersiapkan media Muller Hinton Agar (MHA) kemudian sampel diambil dengan ose dinokulasi pada media, cakram dipasang 2 buah, di tengah-tengah.

Diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada temperatur 37°C (Higgins and Gottschalk, 1990).

Melalui uji mikroskopis dan uji katalase serta uji cakram optochin bahwa koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada pemupukan kedua adalah koloni yang murni, dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan uji biokimiawi (Devriese *et al.*, 1991; Tarradas *et al.*, 1994; Estoepangestie, 1996).

III.3.6. Uji Biokimia

III.3.6.1. Uji amilase

Tujuan uji amilase untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim amilase. Uji amilase dilakukan dengan menggunakan Colombia - Agar (Oxoid, Wessel Jerman) yang mengandung amilum, kemudian isolat sampel ditanam membentuk garis lurus di tengah media. Diinkubasi selama 24 sampai 40 jam pada suhu 37°C , kemudian ditetesi cairan lugol. Hasil positif bila terdapat zona terang disekeliling koloni kuman (Devriese *et al.*, 1991; Estoepangestie, 1996).

III.3.6.2. Uji fermentasi

Uji fermentasi gula-gula meliputi glukosa, laktosa, maltosa, manitol, sorbitol, sukrosa, salisin, dan trehalose dalam konsentrasi 1 %, sebagai indikator digunakan phenol red. Tujuan dari uji fermentasi gula-gula adalah untuk mengetahui adanya

fermentasi gula atau karbohidrat oleh bakteri. Caranya yaitu koloni bakteri dari media pemurnian diambil dengan ose steril dan dimasukkan kedalam media gula-gula yang tersebut di atas. Media gula-gula yang telah dipupuk selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 24 sampai 48 jam. Reaksi positif bila terbentuk asam yang ditandai dengan terjadinya perubahan medium menjadi kuning sebaliknya reaksi negatif bila tidak terjadi perubahan warna medium tetap berwarna merah (Hommez *et al.*, 1986; Higgins *et al.*, 1990; Tarradas, 1994).

III.3.6.3. Uji Voges Proskauer (VP)

Tujuan mengetahui pembentukan acetil metil karbinol (asetoin) dari dektrosa. Dengan menggunakan ose, isolat diambil kemudian dipupuk pada media VP. Dengan cara mengaduk, kemudian dieramkan pada suhu 37⁰ C selama 2 hari, atau pada suhu 30⁰ C selama 5 hari. Uji VP dikatakan positif bila terbentuk warna merah setelah dieramkan selama 5 hari dengan penambahan larutan alpha naphthol 5 % dan KOH 40% (Singlefton, 1992).

III.3.6.4. Uji THB yang mengandung NaCl 6,5 %

Tujuan memupuk *S. suis* pada media mengandung NaCl 6,5% adalah untuk mengetahui kemampuan kuman tumbuh pada lingkungan yang mengandung garam. Uji ini dilakukan dengan cara mengambil isolat kuman dengan ose dan memupukkan

pada media THB agar yang ditambah larutan garam sebanyak 6,5 %, dieramkan pada suhu 37 ° C selama 12 sampai 24 jam. Hasil positif bila kuman dapat tumbuh dengan baik dan hasil negatif bila kuman tidak dapat tumbuh pada media THB yang mengandung NaCl 6,5%. Pada percobaan ini sebagai kontrol digunakan *Staphylococcus aureus* , yang merupakan salah satu spesies kuman yang dapat tumbuh pada media yang mengandung garam (Higgins dan Gottschalk,1990; Gottschalk *et al.*, 1991).

III.3.6.5. Uji Na - Hipurat

Tujuan mengetahui kemampuan kuman dalam menghidrolisa Natrium hipurat menjadi Asam benzoat dan Glisin, sesuai metode Hwang dan Ederer (1975). Satu persen larutan Natrium hipurat sebanyak 0,4 ml, kemudian larutan ini disimpan dalam tabung, dimasukkan pendingin pada suhu -20°C . Pada saat akan digunakan, dilakukan thawing (pencairan) terlebih dahulu. Setelah dithawing baru larutan Natrium hipurat diinokulasi dengan koloni *S. suis*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Untuk mendeteksi glisin digunakan 0,2 ml larutan Ninhidrin. Larutan Ninhidrin dibuat dengan melarutkan 3,5 gram Ninhidrin dalam 100 ml campuran Aseton dan Butanol dengan perbandingan 1:1. Sesudah ditetesi Ninhidrin , larutan yang berisi inokulasi *S. suis* diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Hasil positif bila timbul warna ungu tua , seperti warna ungu pada kristal violet pada perwarnaan Gram, ini berarti bakteri dapat menghidrolisa Na-hipurat. Hasil negatif bila

tidak timbul warna atau timbul warna ungu tersamar (tidak begitu jelas), ini berarti kuman tidak dapat menghidrolisa Na-hipurat.

III.4. Analisis Hasil

Hasil isolasi dan identifikasi berupa informasi spesies bakteri *Streptococcus suis*. Data isolasi dan identifikasi bakteri yang didapatkan akan bersifat data kualitatif, maka disajikan dalam tabulasi secara presentase (Deskriptif).