

SKRIPSI :

FANYWATI KOSASIH

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MYCOBACTERIUM
PARATUBERCULOSIS DARI LYMFOGLANDULA
ILIO – CAECAL KAMBING YANG DIPOTONG
DIRUMAH POTONG HEWAN PEGIRIAN
KOTAMADYA SURABAYA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1987**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS
DARI LYMFOGLANDULA ILIO-CAECAL KAMBING YANG DIPOTONG
DI RUMAH POTONG HEWAN PEGIRIAN
KOTAMADYA SURABAYA

SKRIPSI

DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS
AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN SYARAT GUNA
MEMPEROLEH GELAR DOKTER HEWAN

OLEH

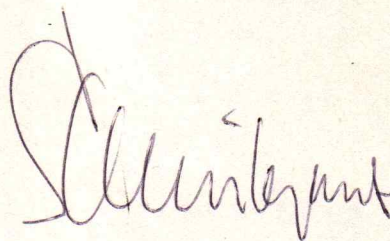
FANYWATI KOSASIH

BANGKALAN



(drh. DIDIK HANDIJATNO, MS.)

Pembimbing Pertama



(drh. SOELISTYANTO.)

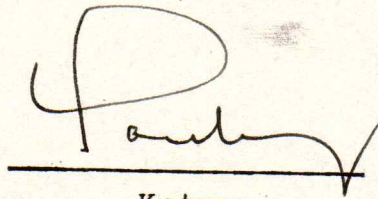
Pembimbing Kedua

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A

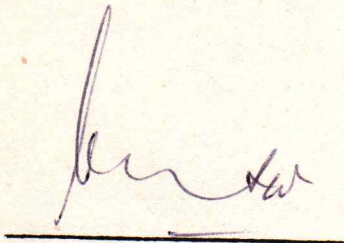
1987

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik scope maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar DOKTER HEWAN

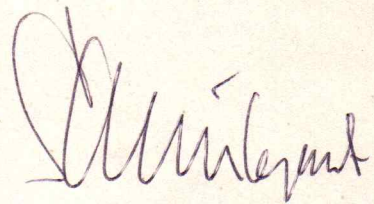
Panitia Penguji



Ketua



Sekretaris



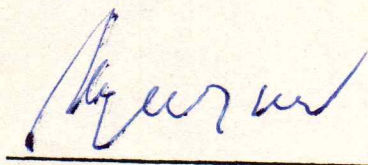
Anggota



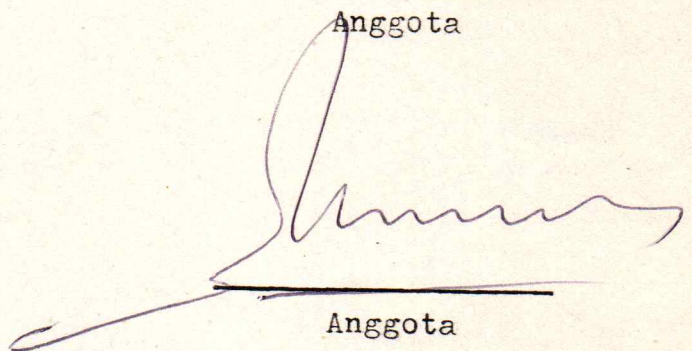
Anggota



Anggota



Anggota



Anggota

UCAPAN TERIMA KASIH

Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang penulis laksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada drh. Didik Handijatno MS, Dosen laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, dan drh. Soelistyanto, Dosen Virologi pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, yang telah memberikan petunjuk, bimbingan serta nasehat kepada penulis mulai dari awal penelitian sampai penulisan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan juga kepada drh. Soewadji, Direktur Utama Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya, yang telah memberikan fasilitas untuk pengambilan bahan penelitian. Semua pihak yang telah membantu penulisan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang Kedokteran Hewan guna menunjang usaha pemerintah dalam peningkatan produksi protein hewani.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
BAB I. PENDAHULUAN	1
1. Latar Belakang Permasalahan	1
2. Tujuan Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
1. Sejarah Penyakit	4
2. Morfologi dan Sifat Pewarnaan	7
3. Sifat Pupukan	7
4. Daya Tahan	9
5. Struktur Antigenik dan Toksin	11
6. Patogenesis	11
7. Diagnosa	13
7.1. Gejala Klinis	13
7.2. Pemeriksaan Laboratoris	14
7.3. Perubahan Patologis Anatomis	17
8. Pengendalian Penyakit	18
8.1. Pencegahan dan Pemberantasan	18
8.2. Pengobatan	20
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	21
1. Bahan	21
2. Cara Kerja	21

2.1. Pemupukan	21
2.1.1. Pemeriksaan Natip	22
2.1.2. Pewarnaan Gram	23
2.1.3. Pewarnaan Ziehl Neelsen	23
2.2. Inokulasi pada Hewan Percobaan	24
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	29
BAB VI. RINGKASAN	30
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel	
I. Hasil pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen	25
II. Hasil pemeriksaan Mikroskopis	26
III. Hasil inokulasi pada hewan percobaan	27
IV. Hasil pemeriksaan laboratoris bakteriologis	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran : 1. Pewarnaan Gram	35
2. Pewarnaan Tahan Asam	
(Metoda Ziehl Neelsen)	36
3. Lowenstein-Jensen	37

BAB I

P E N D A H U L U A N

1. Latar Belakang. Permasalahan.

Dewasa ini kebutuhan akan nilai gizi masyarakat Indonesia, khususnya protein hewani per kapita masih belum memadai. Agar kebutuhan protein hewani per kapita dapat terpenuhi, maka perlu ada peningkatan produksi di bidang peternakan. Salah satu sumber yang dapat memenuhi kebutuhan tersebut adalah dengan mengusahakan ternak kambing.

Pada pelita IV ini terjadi penurunan populasi ternak kambing. Penyebabnya antara lain adalah rendahnya tingkat kelahiran disertai dengan peningkatan pemotongan ternak kambing. Pada umumnya cara pemeliharaan masih merupakan usaha sambilan bagi para petani.

Usaha pemeliharaan kesehatan hewan yaitu dengan cara mengadakan tindakan pencegahan, pemberantasan dan pengobatan penyakit. Penyakit hewan yang bersifat menular perlu mendapat perhatian karena kerugian yang ditimbulkan cukup tinggi.

Paratuberculosis merupakan salah satu penyakit yang dapat menyerang kambing pada semua umur, tetapi yang lebih sering terserang adalah kambing berusia muda yang disebabkan oleh infeksi kuman Mycobacterium paratuberculosis. Penyakit ini bersifat menular dan terjadi secara kronis. Pada kambing dapat menyebabkan diare ringan secara berulang-ulang, hewan terlihat kurus, lemah, depresi dan berakhir dengan kematian (Merchant and Packer, 1967; Gillespie and Timoney, 1981 ;

Ulrich et al, 1982; Beveridge, 1983).

Kejadian paratuberculosis tersebar di seluruh dunia seperti Australia, Selandia Baru, Inggris, Perancis, Jerman, Canada, Belanda, Amerika Serikat, Amerika Selatan, Rusia, India, Denmark, Pakistan, Turki, Yugoslavia, Belgia, Israel, Jepang, Afrika Selatan (Merchant and Packer, 1967; Jensen, 1974).

Di Indonesia pernah dilaporkan di Sumatera (Ressang, 1984).

Usaha pencegahan paratuberculosis merupakan hal yang perlu mendapat perhatian, karena ~~penyakit~~ ini bersifat kronis dan menular. Angka morbiditas pada kambing kira-kira 10% dan angka mortalitas kira-kira 3% (Jensen, 1974).

Pencegahan paratuberculosis dapat dilakukan dengan mengadakan vaksinasi. Sedangkan untuk pengobatan sampai saat ini belum diketahui dengan pasti (Beveridge, 1983).

Kejadian paratuberculosis di Indonesia terutama pada kambing belum banyak data yang dilaporkan. Dengan alasan inilah maka penulis mencoba untuk meneliti kejadian paratuberculosis pada kambing, khususnya yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya.

2. Tujuan Penelitian :

1. Isolasi dan identifikasi kuman Mycobacterium paratuberculosis dari limfoglandula ilio-caecal kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya.

2. Untuk mengetahui persentase kejadian paratuberculosis pada kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Paratuberculosis adalah penyakit menular yang menyerang hewan ruminantia termasuk kambing terutama yang berusia muda. Disebabkan oleh Mycobacterium paratuberculosis atau Mycobacterium johnei, Mycobacterium enteritidis, Johne's bacillus, Bacillus of Johne's disease (Jensen, 1974; Gillespie and Timoney, 1981). Penyakitnya disebut Johne's disease, chronic hyperthrophic enteritis, chronic bacterial enteritis.

1. Sejarah Penyakit

Pada tahun 1881 Hansen dan Hamilton dari Denmark yang dikutip dari Jensen (1974) mempelajari penebalan dan lipatan dari membrana mukosa usus pada sapi yang menderita diare kronis.

Pada tahun 1895 Johne dan Forthinghan dari Jerman yang dikutip dari Merchant and Packer (1967) melaporkan adanya kuman tahan asam pada sapi yang menderita infeksi usus, dan menurut pendapatnya organisme ini mirip dengan kuman Tuberculose avian atau Tuberculose bovine yang menyebabkan perubahan pada saluran usus. Kemudian pada tahun 1906 Bang dari Denmark berpendapat bahwa penyakit ini berbeda dengan tuberculosis dan mengusulkan nama paratuberculosis. Penyakit tersebut menjadi perhatian para penyelidik di Inggris pada tahun 1907.

Pada tahun 1911 Twort dan Ingram dari Inggris yang dikutip dari Jensen (1974) berhasil mengisolasi Mycobacterium paratuberculosis dan mendapatkan kultur murni pada media buatan yang mengandung kuman tuberkel yang mati.

Pada tahun 1922 Beach dan Hasting yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) pertama kali menggunakan Johnin atau paratuberculin untuk intra vena test. Pada tahun 1943 Mc Intosh dan Konst dari Canada dan tahun 1944 Johnson dan Cox dari Amerika Serikat dan sejumlah ahli dari Inggris memproduksi Johnin yang ampuh untuk skin test secara intradermal.

Pada tahun 1943 di Amerika Serikat yang dikutip dari Ulrich et al (1982) untuk pertama kali melaporkan kejadian paratuberculosis pada kambing.

Pada tahun 1943 Francis dari Inggris yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) berhasil menularkan kuman ini pada tikus dan hamster umur 13 sampai 14 hari melalui mulut dengan dosis besar. Pada tahun 1945 Stewart, Mc-Callum dan Taylor menemukan adanya penurunan haemoglobin, calcium dan magnesium darah sapi dan domba yang menderita paratuberculosis. Pada tahun 1949 Taylor berhasil mengisolasi kuman Mycobacterium paratuberculosis dari 243 contoh, 15% ternyata positif . Contoh untuk bahan pemeriksaan ini berupa limfoglandula ilio-caecal sapi di rumah potong Berkshire di Inggris . Ini menunjukkan bahwa infeksi terbanyak oleh Mycobacterium paratuberculosis di Eropah terdapat di negara Inggris. Pada

tahun 1954 di Selandia Baru pernah dilaporkan kejadian paratuberculosis pada domba, sedang pada tahun 1954 Stamp dan Watt di Scotlandia mempelajari perubahan patologi anatomisnya.

Pada tahun 1954 Doyle yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) memeriksa jaringan ambing dari 34 ekor sapi yang memperlihatkan gejala klinis paratuberculosis dan mendapatkan kultur yang positif dari susu. Pada tahun 1954 Rankin dapat mengisolasi Mycobacterium paratuberculosis dari limfoglandula ilio-caecal, dengan memperoleh hasil 6% dan 7,5% dari 2 kelompok sapi di Inggris yang kelihatannya normal. Pada tahun 1955 Pearson di Inggris juga melaporkan dua kasus paratuberculosis pada mukosa uterus sapi dari salah satu foetus penderita terdapat kuman Mycobacterium paratuberculosis yang di isolasi dari limfoglandula ilio-caecal dan usus.

Pada tahun 1958 Smith yang dikutip dari Soltys (1963) melaporkan kasus Mycobacterium paratuberculosis dari 100 ekor sapi di rumah potong didapatkan 7 positif dan kebanyakan berasal dari limfoglandula retropharyngeal. Dengan demikian Smith berpendapat bahwa pharynx merupakan jalan infeksi yang penting.

Pada tahun 1967 Kopecky et al, yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) melaporkan kejadian paratuberculosis setelah mengadakan pemeriksaan pada 148 ekor sapi yang diambil dari 1000 ekor, ternyata 18 ekor yang menunjukkan

infeksi pada uterus tanpa memperlihatkan gejala klinis sebelumnya. Pada tahun 1970 Larsen dan Kopecky mengadakan pemeriksaan pada alat kelamin dari 6 ekor sapi jantan yang menunjukkan gejala klinis paratuberculosis dan mendapatkan kuman Mycobacterium paratuberculosis pada organ tersebut.

2. Morfologi dan Sifat Pewarnaan

Mycobacterium paratuberculosis merupakan kuman yang berbentuk batang, mempunyai ukuran diameter 0,5 sampai 1,0 mikron dengan panjang 1 sampai 2 mikron. Kuman Mycobacterium paratuberculosis mempunyai sifat non motil tidak membentuk kapsul dan tidak membentuk spora. Dengan pewarnaan Gram bersifat Gram positif. Pada umumnya digunakan pewarnaan tahan asam atau metode Ziehl Neelsen dan dengan pewarnaan ini bersifat tahan asam. Pada sediaan langsung yang berasal dari membrana mukosa usus yang terinfeksi, kuman Mycobacterium paratuberculosis terlihat bergerombol atau sendiri - sendiri (Soltys, 1963; Merchant and Packer, 1967; Joklik et al , 1980).

3. Sifat Pupukan

Mycobacterium paratuberculosis bersifat aerobik dan tumbuh pada suhu antara 28°C sampai 43°C, tetapi untuk pertumbuhan yang baik memerlukan suhu optimum yaitu 37°C dengan pH. 6,6. Kuman ini sukar dibiakkan pada media buatan biasa.

Pada tahun 1911 Twort dan Ingram yang dikutip dari Soltys (1963) dan Merchant and Packer (1967) untuk pertama kali berhasil menumbuhkan kuman ini pada media buatan (Dorset's egg media) yang sebelumnya di tambah dengan glycerol dan kuman Mycobacterium paratuberculosis yang sudah di bunuh.

Pada tahun 1953 Francis et al, yang dikutip dari Soltys (1963) dan Gillespie and Timoney (1981) berhasil mengekstraksi Mycobacterium phlei yang dipergunakan untuk faktor pertumbuhan bagi kuman Mycobacterium paratuberculosis. Ekstraksi dari kuman tahan asam yang bersifat saprofit ini diberi nama mycobactin.

Pada tahun 1958 Smith yang dikutip dari Soltys (1963) mengatakan bahwa untuk isolasi pertama Mycobacterium paratuberculosis membutuhkan 20% serum dan ekstrak alkohol dari Mycobacterium phlei pada media cair Dubo's. Juga subkultur dari strain ovine berpigmen tumbuh pada media Dubo's berbentuk gerombolan kecil.

Pada tahun 1964 Merkal et al, yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) menganjurkan egg yolk agar yang mengandung glycerin dan ekstrak Mycobacterium paratuberculosis. Untuk mencegah kuman lain pada bahan pemeriksaan, maka sebelum diinokulasikan ke dalam Herrald's media (egg yolk agar di tambah mycobactin) perlu ditambahkan larutan benzolkonium chlorida atau natrium hidroksida. Pada egg yolk media yang mengandung ekstrak Mycobacterium phlei, Mycobacterium paratuberculosis membentuk koloni kecil, berwarna putih su -

ram dan ini akan terlihat setelah 4 minggu kemudian. Koloni ini makin lama semakin bertambah besar dan warnanya putih kekuningan. Pada pemupukan media cair yaitu pada media kaldu glycerin yang mengandung ekstrak Mycobacterium phlei atau Mycobacterium lainnya terlihat pertumbuhan kuman yang berbentuk selaput tipis pada permukaan media dan semakin lama koloni kuman dapat membentuk selaput yang lebih tebal atau selaput yang berlapis.

Pada tahun 1974 Merkal dan Curran yang dikutip dari Gillespie and Timoney (1981) mengatakan bahwa Mycobacterium paratuberculosis yang di isolasi tidak mampu mengekstraksi ion ferri yang cukup dari medium tersebut. Mycobacterium lain seperti Mycobacterium phlei mampu memisahkan ion ferri yang cukup, sehingga dapat merangsang pertumbuhan Mycobacterium paratuberculosis.

Pada tahun 1981 Wilks et al, berhasil mengisolasi Mycobacterium paratuberculosis dari faeces sapi penderita paratuberculosis dengan menggunakan media Lowenstein-Jensen . Koloni Mycobacterium paratuberculosis tampak setelah 2 minggu kemudian dengan ciri-ciri berbentuk konvek, kecil, kering dan berwarna putih kekuningan.

4. Daya Tahan

Mycobacterium paratuberculosis merupakan suatu kuman yang patogen pada sapi, domba dan kambing. Paratuberculosis dapat juga menyerang beberapa hewan ruminantia lainnya. Se -

lain itu penyakit ini pernah dilaporkan pada babi, rusa, kuda, unta, kera dan ayam. Hewan usia muda lebih rentan dibandingkan hewan tua. Hewan percobaan seperti marmut, tikus, hamster dan kelinci tidak rentan dengan infeksi secara alami, tetapi infeksi secara buatan dapat terjadi dan pada pemeriksaan histopatologis dapat menunjukkan lesi-lesi pada mukosa usus (Soltys, 1963; Merchant and Packer, 1967; Smith et al, 1972; Beveridge, 1983).

Kuman Mycobacterium paratuberculosis mempunyai bentuk seperti kuman tuberculose yang lain, tahan terhadap panas, tahan terhadap asam dan alkali, tahan terhadap sinar matahari dan kekeringan (Blood and Handerson, 1981; Gillespie and Timoney, 1981).

Pertumbuhan kuman dapat dihambat selama 15 menit di dalam larutan cresylic compounds 1:64, phenol 1:40, sodium ortho phenate 1:100, alkohol 95%, mercury biochloride 1:1000 calcium phosphochloride 1:50 dan methylen blue 1:500 (Merchant and Packer, 1967; Jensen, 1974).

Pada tahun 1944 Lovel et al, yang dikutip dari Soltys (1963) mengatakan bahwa kultur yang dibuat dari hasil ke-rokan mukosa usus yang dibiarkan di dalam air steril dapat tahan lebih dari 9 bulan. Dalam air sungai kuman tahan selama 163 hari. Di dalam faeces yang tercemar secara alami kuman dapat hidup selama 152 sampai 246 hari.

Pada tahun 1956 Larsen et al, yang dikutip dari Merchant and Packer (1967) mengatakan bahwa bila Mycobacteri-

um paratuberculosis di simpan pada suhu -14°C dapat hidup selama 12 bulan, sedangkan pada suhu 4°C dapat hidup selama 5 bulan dan pada suhu 38°C dapat hidup selama 8 bulan.

5. Struktur Antigenik dan Toksin

Struktur antigenik dari kuman Mycobacterium paratuberculosis sampai saat ini belum diketahui dengan pasti, tetapi kemungkinan ada persamaannya dengan kuman Mycobacterium tuberculosis type avian. Pada test alergi dengan menggunakan avian tuberculin menunjukkan bahwa sebagian besar penderita paratuberculosis memberikan hasil yang positif, sehingga beberapa ahli berpendapat kuman Mycobacterium paratuberculosis juga mengandung protein dan polysacharida yang merupakan antigen tuberculosis (Johnson, 1977; Beveridge, 1983).

Kuman Mycobacterium paratuberculosis menghasilkan endotoksin akan tetapi tidak menghasilkan eksotoksin (Merchant and Packer, 1967).

6. Patogenesis

Mycobacterium paratuberculosis dapat ditularkan melalui faeces penderita atau melalui alat-alat yang tercemar oleh kuman Mycobacterium paratuberculosis, misalnya alat pengangkut makan ternak, air dan sebagainya (Jensen, 1974 ; Siegmund, 1979; Beveridge, 1983).

Kuman ini mempunyai predileksi pada saluran pencernaan. Infeksi per-oral Mycobacterium paratuberculosis, masuk

ke dalam saluran pencernaan, kemudian memperbanyak diri pada usus, terutama ileum, caecum dan colon. Kuman yang dapat hidup lebih lama akan menembus membran epitel dan masuk ke dalam lamina propria. Pada jaringan ikat dapat menyebabkan perubahan-perubahan. Pada mulanya terdapat peningkatan jumlah neutrofil di sekitar dan di antara kuman, kemudian diikuti pertambahan makrofag dan limfosit yang berkumpul di daerah tersebut dan akhirnya fibrosit mengadakan proliferasi. Dalam jumlah yang besar makrofag memfagositose kuman dan sesudah itu masuk dalam pembuluh limfe afferent dan menuju ke limfoglandula mesenterica dan disini kuman akan memperbanyak diri. Pada mukosa usus yang tertular terdapat penebalan dan pengkerutan disebabkan adanya proliferasi dari sel-sel epiteloid dan limfoglandula mesenterica membengkak (Jennings, 1970).

Adanya penebalan mukosa usus dapat menyebabkan penurunan aktifitas enzim dalam mukosa usus, misalnya enzim adenyl cyclase yang berfungsi merubah ATP menjadi CAMP. Akibat aktifitas enzim adenyl cyclase menurun maka perubahan ATP menjadi CAMP pada mukosa usus terganggu, sehingga penyerapan zat-zat makanan dalam usus halus terganggu. Zat-zat makanan yang tidak terserap dalam usus halus akan menyebabkan perubahan tekanan osmotik dan peningkatan gerakan peristaltik, sehingga mengakibatkan terganggunya gerakan cairan antara jaringan interstisial dan lumen usus halus yang merupakan faktor penyebab terjadinya diare. Kuman Mycobacterium paratuberculosis -

berculosis dapat ditemukan pada faeces penderita. Diare yang hebat akan mengakibatkan gangguan metabolisme air, sehingga dapat menimbulkan dehidrasi. Gejala klinis yang lain yaitu anemia dan kekurangan (Soltys, 1963; Smith et al, 1972; Beveridge, 1983). Pada pemeriksaan darah, terdapat penurunan haemoglobin, calcium dan magnesium dalam darah (Jensen , 1974). Kematian dapat terjadi sebagai akibat dari dehidrasi, asidosis metabolik, hilangnya cairan elektrolit dan gangguan fungsi jantung (Smith et al, 1972; Jensen, 1974).

Organ tubuh yang lain seperti jantung, hati, ginjal, paru dan limpa dapat diserang paratuberculosis dan menyebabkan terjadinya lesi pada organ tersebut. Sedangkan pada lymphoglandula yang lain dapat terjadi pembengkakan (Smith et al 1972).

7. Diagnosa

Pada umumnya diagnosa penyakit ini disebabkan oleh Mycobacterium paratuberculosis pada kambing didasarkan pada gejala klinis, pemeriksaan laboratoris dan perubahan patologi anatomis.

7.1. Gejala Klinis

Secara klinis lama masa inkubasi dari penyakit ini sulit ditentukan dengan pasti dan gejala yang ditimbulkan sering dikacaukan dengan gejala yang ditimbulkan oleh penyakit lain seperti coccidiosis, salmonellosis, colibacillosis dan

mukosal disease. Pada hewan yang terinfeksi kuman ini selama beberapa tahun tidak menunjukkan gejala diare yang jelas terutama jika pemberian makanan dan management pemeliharaannya baik (Siegmund, 1979; Blood and Handerson, 1981).

Pada paratuberculosis biasanya suhu tubuh dan napsu makan tetap normal. Bagi hewan yang menderita penyakit ini dapat terjadi anemia, bulu rontok serta kulitnya menjadi kering. Kekurangan gizi pada saat terakhir biasanya mengakibatkan timbulnya oedema terutama pada bagian rahang bawah. Jika diare terjadi terus-menerus maka akibatnya adalah dehidrasi sehingga kambing menjadi lemah, depresi dan berakhir dengan kematian (Anonymous, 1976; Blood and Handerson, 1981; Gillespie and Timoney, 1981; Beveridge, 1983).

7.2. Pemeriksaan Laboratoris

Untuk diagnosa paratuberculosis pada umumnya adalah merupakan gabungan dari beberapa metode pemeriksaan laboratoris, yang dilakukan secara : pemeriksaan mikroskopis, pupukan, test allergis, serologis dan hewan percobaan.

Pemeriksaan mikroskopis bahannya dapat berasal dari faeces, kerokan mukosa rektum atau dari lymfoglandula ilio-caecal. Untuk pemeriksaan preparat sentuh dari potongan melintang lymfoglandula secara mikroskopis sulit untuk menemukan kuman Mycobacterium paratuberculosis, karena kuman hidup secara intraselluler.

Untuk pupuk contoh bahan yang digunakan yaitu 1 gram faeces dilarutkan dalam 20 ml NaCl fisiologis pada tabung centrifuge, kemudian di centrifuge 1500 rpm selama 5 menit. Sebanyak 2,5 ml dari cairan supernatan diambil dan ditambahkan 17,5 ml benzalkonium khlorid 0,3 % pada tabung reaksi . Sesudah disimpan selama 24 jam pada suhu kamar, supernatan dibuang dan sedimen diinokulasikan pada media miring dari Herrold yang berisi ferric mycobactin. Kemudian media miring tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 4 minggu atau lebih dan pemeriksaan dilakukan pewarnaan tahan asam atau Ziehl Neelsen (Lenghaus et al, 1977; Cottral, 1978; Wilks et al, 1981).

Pada test allergis bahan yang digunakan yaitu Johnin atau paratuberculin atau avian tuberculin dan test ini dapat dilakukan dengan skin test atau intra vena test. Untuk skin test dilakukan pada daerah sebelah lateral leher dan bahan yang digunakan 0,2 ml Johnin yang disuntikkan secara intra dermal, sesudah 48 jam hasil test dibaca. Reaksi disebut positif bila terjadi penebalan pada kulit sebanyak 3 mm. Pertambahan ketebalan kulit antara 2 - 3 mm disebut dubious dan kurang dari 2 mm negatif (Merchant and Packer, 1967; John - son et al, 1977). Sedangkan intra vena test dapat dilakukan dengan menggunakan Johnin atau avian tuberculin dengan dosis 10 ml. Reaksi positif ditandai dengan kenaikan suhu 2° F (1°C) pada 5 sampai 8 jam sesudah injeksi (Beveridge , 1983).

Pada pemeriksaan serologis dapat dilakukan Complement Fixation Test (CFT), Fluorescent Antibody Tehnik (FAT), Haemagglutination Test (HA Test) dan Haemagglutination Inhibition Test (HI Test). Bahan yang digunakan untuk Complement Fixation Test yaitu mukosa usus kering yang mengandung Mycobacterium paratuberculosis sebagai antigen. Bila pada test tidak terjadi hemolisis pada titer 1:8 maka dinyatakan negatif, sedangkan bila pada titer 1:16 dubious dan titer 1:32 atau lebih disebut positif (Soltys, 1963; Blood and Handerson, 1981; Wilks et al, 1981). Complement Fixation Test ini sering kali memberikan reaksi positif pada kambing yang terular oleh Corynebacterium renale, sehingga Complement Fixation Test kurang baik untuk mendiagnosa paratuberculosis (Beveridge, 1983). Untuk Fluorescent Antibody Tehnik serum yang akan diperiksa, terlebih dahulu dicampur fluoresen dengan titer 1:8, 1:16 dan 1:32. Serum ditambahkan pada antigen Mycobacterium paratuberculosis. Pemeriksaan dilakukan dengan memakai sinar ultra violet. Bila serum yang diperiksa mengandung antibodi maka terlihat warna fluoresen. Titer 1:8 dinyatakan dubious dan titer 1:16 atau lebih dinyatakan positif (Gilmour, 1976). Sedangkan untuk HA Test antigen dibuat dari purified protein derivative johnin atau PPD (10 mg dilarutkan dalam 6 ml NaCl fisiologis). Antigen yang telah tersedia ditambahkan eritrosit kambing. Bila terjadi haemagglutinasia maka hewan tersebut diduga menderita paratuberculosis (Soltys, 1963; Gilmour, 1976). Kemudian di-

lanjutkan dengan HI Test yaitu antigen (Johnin) ditambah antisera Mycobacterium paratuberculosis dan ditambah lagi eritrosit kambing. Bila tidak terjadi haemagglutinasia maka disebut positif (Gilmour, 1976).

Hewan percobaan yang biasa digunakan untuk mengetahui keganasan Mycobacterium paratuberculosis adalah pedet dan domba, selain itu dapat juga marmut, tikus, hamster dan kelinci. Dengan pemberian secara per-oral atau intra vena kultur Mycobacterium paratuberculosis, maka terjadi diare. Pada pemeriksaan patologis anatomis terlihat adanya lesi pada usus yang khas untuk paratuberculosis (Gilmour, 1976; Gillespie and Timoney, 1981).

Pada pemeriksaan laboratoris yang tersebut diatas sering timbul reaksi silang dengan penyakit lain, sehingga pemeriksaan yang sering dilakukan yaitu cara pupukan, mikroskopis dan hewan percobaan.

7.3. Perubahan Patologis Anatomis

Pada pemeriksaan post-mortem terlihat adanya kekurangan dan anemia juga memperlihatkan perubahan pada saluran pencernaan, limfoglandula mesenterica dan limfoglandula ilio-caecal. Lesi paling berat terlihat pada mukosa ileum, caecum dan bagian pertama dari colon yaitu colon tenue, sedang pada kasus yang khronis lesi dapat juga meluas sampai rektum. Perubahan ini ditandai penebalan dari membrana mukosa usus dengan warna kuning pucat dan terjadi lipatan pada mukosa

yang tidak dapat diratakan. Sedangkan lymfoglandula mesenterica dan ilio-caecal terjadi kebengkakan karena oedema. Pada pemeriksaan histopatologis lamina propria mukosa usus terlihat adanya penimbunan sel plasma, sel raksasa, limfosit, eosinofil, makrofag dan proliferasi fibrosit. Hal ini menyebabkan perubahan pada vili-vili usus, sel-sel epiteloid menjadi kabur atau hilang dan akhirnya akan terjadi perubahan pada membrana mukosa usus. Pada lymfoglandula mesenterica dan ilio-caecal terlihat peningkatan jumlah sel plasma, sel raksasa dan eosinofil (Soltys, 1963; Jennings, 1970; Beveridge, 1983; Ressang, 1984).

Walaupun lesi pada paratuberculosis biasanya terbatas pada usus dan lymfoglandula mesenterica, tetapi baik secara infeksi alami maupun infeksi secara buatan pada kambing dapat juga terjadi lesi pada hati, limpa, paru, ginjal, uterus placenta dan lymfoglandula yang lain (Smith et al, 1972).

8. Pengendalian Penyakit

8.1. Pemberantasan dan Pencegahan

Pemberantasan dan pencegahan penyakit paratuberculosis dilakukan dengan vaksinasi. Vaksin dapat berasal dari suspensi kultur Mycobacterium paratuberculosis yang hidup dalam larutan minyak paraffin atau dapat berasal dari kuman Mycobacterium paratuberculosis yang dimatikan dengan 0,5% phenol dicampur dengan minyak paraffin, disuntikkan secara subcutan. Sedangkan vaksin dari kuman mati dapat berasal dari dinding

sel kuman yang utuh dan pecahan dinding sel kuman (Soltys, 1963; Larsen et al, 1978; Blood and Handerson, 1981).

Cara untuk memperoleh vaksin kuman mati yang berasal dari dinding sel kuman yang utuh yaitu kuman Mycobacterium paratuberculosis dipupuk pada medium buatan Dorset dan Henley's selama 2 minggu. Kemudian kuman dipisahkan dari medium, diambil dan dikeringkan. Selanjutnya kuman Mycobacterium paratuberculosis dalam jumlah banyak dicampur dengan minyak mineral 50 mg/ml di dalam mortir. Campuran tersebut dimasukkan dalam botol dengan dosis 0,8 ml dan disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 5 menit (Larsen et al , 1978).

Sedangkan cara untuk memperoleh vaksin kuman mati yang berasal dari pecahan dinding sel kuman yaitu kuman Mycobacterium paratuberculosis dipupuk pada medium buatan Dorset dan Henley's selama 2 minggu. Kemudian kuman dipisahkan dari medium, diambil, dikeringkan dan ditimbang sebanyak 5 gram. Selanjutnya dicampur dengan aquadest sebanyak 12 ml dan diletakkan pada mesin homogen sel selama 3 periode, masing-masing periode 2 menit dengan 4000 getaran/menit. Untuk periode yang satu ke periode berikutnya diletakkan pada pecahan es supaya dingin. Gelas merjan diambil dan ditambahkan dengan aquadest, dicentrifuge 5000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatannya dibuang. Vaksin dipersiapkan dari campuran sedimen dengan protoplasma dan sebagian adjuvan Freund's. Hasil akhir berisi 25 mg (berat kering) dari campuran se -

dimen dan protoplasma dengan berat yang sama per-mililiter. Vaksin dimasukkan dalam botol dengan dosis 0,8 ml disterilkan dalam autoclave suhu 121°C selama 5 menit. Untuk penyimpanan dalam jangka waktu yang lama vaksin diletakkan di tempat dingin (Larsen et al, 1978).

Vaksinasi diutamakan pada daerah yang bebas tuberculo-sis. Efek samping yang ditimbulkan setelah vaksinasi adalah penebalan pada bekas suntikan dan hewan yang divaksin menjadi hipersensitif terhadap reaksi tuberculin test (Merchant and Packer, 1967; Gilmour, 1976; Schaaf, 1977; Larsen et al, 1978; Siegmund, 1979).

8.2. Pengobatan

Cara pengobatan paratuberculosis sampai saat ini belum diketahui, pemberian preparat sulfa atau antibiotika memberikan hasil yang kurang memuaskan. Pernah dicoba dengan pemberian preparat streptomycin, viomycin dan isoniazide secara in-vitro memberikan hasil yang cukup baik (Blood and Han - derson, 1981; Gillespie and Timoney, 1981; Beveridge, 1983). Untuk mengurangi dehidrasi atau hipoglycemia akibat diare dapat diberikan air minum bersih dan larutan glukosa (Siegmund, 1979).

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

1. B a h a n

Pada penelitian ini bahan yang digunakan dalam pemeriksaan yaitu berupa lymfoglandula ilio-caecal kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya . Pengambilan bahan dilakukan secara random sebanyak 60 sampel kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik, selanjutnya dimasukkan dalam termos yang berisi es langsung dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, untuk diperiksa secara bakteriologis. Hewan percobaan untuk inokulasi isolat yang diduga mengandung Mycobacterium paratuberculosis digunakan marmut yang diperoleh dari pasar.

2. Cara Kerja

Untuk mengetahui ada tidaknya Mycobacterium paratuberculosis di dalam bahan pemeriksaan yang berupa lymfoglandula ilio-caecal kambing, maka dilakukan pemeriksaan laboratoris bakteriologis yang meliputi : pemupukan dan inokulasi pada hewan percobaan.

2.1. Pemupukan

Setiap sampel dipupuk pada medium Lowenstein-Jensen, yang ditambah dengan kuning telur dan glycerin. Pemupukan pada medium ini bertujuan untuk menumbuhkan dan memperbanyak

kuman Mycobacterium paratuberculosis. Tetapi sebelumnya lymfoglandula ilio-caecal dipisahkan dari lemaknya dan dipotong kecil-kecil, lalu dimasukkan dalam mortir di tambah pasir kuarsa dan digerus sampai halus. Kemudian ditambah dengan larutan KOH 0,25 N dan 2 tetes phenol red 1% dengan pH 8,0 dibiarkan selama 10 menit, supaya penyerapan terjadi secara sempurna oleh gerusan lymfoglandula tersebut. Untuk mencapai pH optimal yaitu 6,0 - 6,9 maka campuran harus dinetralkan dengan larutan HCL 0,1 N, kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit lalu supernatannya dibuang. Suspensi lymfoglandula ilio-caecal diambil dengan ose kemudian dipupuk pada medium Lowenstein-Jensen dengan cara streak dan di inkubasi pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan setiap minggu sampai pada minggu ke 4 dengan melihat pertumbuhan dari koloni kuman. Pertumbuhan kuman baru terlihat setelah di inkubasikan 2 minggu. Bila ditemukan atau diduga terdapat pertumbuhan koloni Mycobacterium paratuberculosis, maka akan terlihat koloni kuman yang berbentuk konvek, kecil kering dan berwarna putih kekuningan. Koloni yang diduga dilakukan pemeriksaan mikroskopis yaitu preparat ulas secara natip, pewarnaan Gram, pewarnaan Ziehl Neelsen.

2.1.1. Pemeriksaan Preparat Natip

Pemeriksaan preparat natip mempunyai tujuan untuk mengetahui ada tidaknya pergerakan kuman. Koloni kuman dari medium Lowenstein-Jensen diambil dengan ose, diletakkan pada

obyek glass, diperiksa dibawah mikroskop.

2.1.2. Pemeriksaan dengan Pewarnaan Gram

Pewarnaan ini bertujuan untuk membedakan apakah kuman tersebut bersifat Gram positif atau Gram negatif. Koloni kuman dari medium Lowenstein-Jensen diambil dengan ose, dibuat preparat ulas pada obyek glass, fiksasi diatas nyala api, diwarnai dengan carbol gentian violet selama 3 menit zat warna dibuang kemudian diberi lugol selama 1 menit, dilunturkan dengan alkohol aceton, lalu dicuci dengan air kran kemudian diwarnai dengan saffranin selama 3 menit, dicuci dengan air, keringkan dengan kertas penghisap dan ditetesi dengan minyak emersi, kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Pada pewarnaan Gram Mycobacterium paratuberculosis bersifat Gram positif (warna violet).

2.1.3. Pemeriksaan dengan Pewarnaan Ziehl Neelsen

Pewarnaan ini bertujuan untuk membedakan apakah kuman tersebut bersifat tahan asam atau tidak. Koloni kuman dari medium Lowenstein-Jensen diambil dengan ose, diwarnai dengan carbol fuchsin, panasi sampai timbul uap, diamkan selama 5 menit, zat warna dibuang, dicuci dengan air kran, kemudian diwarnai dengan methylen blue selama 1 menit, lalu dicuci dengan air kran, keringkan dengan kertas penghisap dan ditetesi minyak emersi, diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Pada pewarnaan ini Mycobacterium paratuberculosis bersifat tahan asam (warna merah).

2.2. Inokulasi pada Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah marmut. Marmut tersebut disuntik dengan kuman dari medium tersangka dengan cara subcutan. Setelah 4 minggu marmut disuntik dengan tuberculin sebanyak 0,5 cc secara intra muskuler, marmut penderita tuberculosis disuntik dengan tuberculin setelah 12 sampai 18 jam akan mati. Jika bahan yang disuntikkan adalah kuman Mycobacterium paratuberculosis, maka setelah penyuntikan tuberculin 0,5 cc secara intra muskuler marmut tetap hidup selanjutnya marmut dibunuh dan diseksi. Lymfoglandula diambil kemudian digerus untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl Neelsen (Merchant and Packer, 1967).

Penelitian ini penulis lakukan mulai tanggal 4 Agustus sampai 6 Oktober 1986. Pemeriksaan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pemeriksaan laboratoris bakteriologis yang meliputi : pemupukan dan inokulasi pada hewan percobaan. Sampel yang digunakan adalah 60 berupa lymfoglandula ilio-caecal kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya. Maka hasil pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I : Hasil pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen

No. Sampel	LOWENSTEIN-JENSEN	No. Sampel	LOWENSTEIN-JENSEN
1	-	31	-
2	+	32	+
3	-	33	+
4	+	34	+
5	-	35	-
6	+	36	+
7	+	37	-
8	-	38	+
9	+	39	-
10	-	40	+
11	-	41	-
12	-	42	+
13	-	43	-
14	+	44	-
15	-	45	-
16	-	46	-
17	+	47	-
18	-	48	-
19	+	49	-
20	+	50	-
21	-	51	-
22	+	52	-
23	-	53	-
24	+	54	-
25	+	55	-
26	-	56	-
27	-	57	-
28	-	58	-
29	-	59	-
30	+	60	-

Keterangan :

Pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen dikatakan (+): terdapat pertumbuhan koloni kuman yang berbentuk konvek, kecil, kering dan berwarna putih kekuningan.

Pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen dikatakan (-): tidak terdapat pertumbuhan koloni kuman.

Dari hasil pemupukan pada medium Lowenstein - Jensen yang menunjukkan ciri-ciri koloni kuman Mycobacterium paratu berculosis adalah sampel nomer 2, 4, 6, 7, 9, 14, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 30, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 42. Kemudian dilakukan pemeriksaan mikroskopis yaitu dibuat preparat ulas natip, pewarnaan Gram, pewarnaan Ziehl Neelsen. Hasilnya dapat dilihat pada tabel II.

Tabel II : Hasil pemeriksaan mikroskopis

NO. SAMPEL	NATIP	GRAM	Z.N	NO. SAMPEL	NATIP	GRAM	Z.N
2	-	+	-	24	-	+	-
4	-	+	-	25	-	+	-
6	-	+	-	30	-	+	-
7	-	+	-	32	-	+	-
9	+	+	+	33	-	+	-
14	-	+	-	34	-	+	-
17	+	+	+	36	-	+	-
19	-	+	-	38	-	+	-
20	-	+	-	40	-	+	-
22	+	+	+	42	-	+	-

Keterangan :

Natip (+) : tidak ada pergerakan kuman atau non motil, di
duga terdapat Mycobacterium paratuberculosis.

Gram (+) : bersifat Gram positif, batang, coccus, bergerombol.

Z.N (+) : tahan asam, bentuk batang, bergerombol.

Natip (-) : ada pergerakan kuman atau motil.

Z.N (-) : tidak tahan asam, coccus, batang, bergerombol.

Dari hasil pemeriksaan mikroskopis pada sampel nomer 2, 4, 6, 7, 14, 19, 20, 24, 25, 30, 32, 33, 34 36, 38, 40 , 42, tidak menunjukkan ciri-ciri kuman Mycobacterium paratuberculosis. Hal ini karena medium Lowenstein-Jensen bukan merupakan medium selektif untuk Mycobacterium paratuberculosis sehingga kuman lain dapat tumbuh.

Pada sampel nomer 9, 17, 22 dengan pemeriksaan mikroskopis menunjukkan ciri-ciri kuman Mycobacterium paratuberculosis kemudian di inokulasikan pada hewan percobaan, maka didapat hasil sebagai berikut tabel III.

Tabel III : Hasil inokulasi pada hewan percobaan.

NO. SAMPEL	INOKULASI	PEWARNAAN ZIEHL NEELSEN
9	+	+
17	+	+
22	+	+

Keterangan :

Inokulasi (+) : hewan percobaan tidak mati.

Pewarnaan Ziehl Neelsen (+) : bentuk batang, . tahan asam, sendiri-sendiri.

Dari hasil pemeriksaan laboratoris bakteriologis yang meliputi : pemupukan pada medium Lowenstein-Jensen, pemeriksaan mikroskopis dengan preparat ulas natip, pewarnaan Gram, pewarnaan Ziehl Neelsen dan inokulasi pada hewan percobaan marmut, dapat dilihat pada tabel IV.

Tabel IV : Hasil pemeriksaan laboratoris bakteriologis

JUMLAH SAMPEL	JUMLAH YANG POSITIP	%
60	3	5

Keterangan :

Dari 60 sampel yang diperiksa, ternyata diperoleh hasil 3 sampel atau 5% positip Mycobacterium paratuberculosis.

Lymfoglandula merupakan pertahanan tubuh bagi hewan, maka bila kuman ditemukan dalam lymfoglandula berarti hewan telah terinfeksi. Dengan demikian lymfoglandula ilio-caecal kambing yang penulis teliti dari Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya adalah positip Mycobacterium paratuberculosis.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Setelah dilakukan suatu penelitian berdasarkan pemeriksaan bakteriologis (Isolasi dan identifikasi) terhadap 60 sampel lymfoglandula ilio-caecal kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya diperoleh hasil 3 sampel yang mengandung Mycobacterium paratuberculosis berarti ada 5% dari sampel yang diperiksa adalah positif Myco - bacterium paratuberculosis. Dengan ditemukannya Mycobacterium paratuberculosis dalam penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa :

- a. Mycobacterium paratuberculosis ditemukan di Surabaya khususnya di Rumah Potong Hewan Pegirian.
- b. Mycobacterium paratuberculosis yang ditemukan dari lymfoglandula ilio-caecal kambing adalah 5% dari 60 sampel yang diperiksa.

Untuk pengobatan yang efektif terhadap paratuberculosis sampai saat ini belum diketahui maka saran yang dapat diberikan :

- a. Harus diperhatikan mengenai sanitasi lingkungan dan hygiene makanan, kebersihan air minum serta selokan pembuangan kotoran.
- b. Mengisolasi jika ada hewan yang sakit.
- c. Pemberian vaksinasi.

BAB VI

RINGKASAN

Paratuberculosis atau Johne's Disease merupakan penyakit yang sering menyerang ternak yang bersifat kronis dan menular. Paratuberculosis disebabkan oleh infeksi kuman Mycobacterium paratuberculosis. Hewan yang diserang oleh penyakit ini dapat menimbulkan kerugian ekonomi berupa penurunan berat badan, produksi susu menurun dan menimbulkan kematian.

Mycobacterium paratuberculosis berbentuk batang kecil, dengan panjang 1 mikron sampai 2 mikron dan mempunyai diameter 0,5 mikron. Kuman ini tidak mempunyai kapsul, tidak berpora dan tidak bergerak. Pada pewarnaan Gram bersifat Gram positif, pada pewarnaan Ziehl Neelsen bersifat tahan asam. Mycobacterium paratuberculosis mempunyai habitat pada usus halus sampai ke rektum.

Paratuberculosis tersebar di seluruh dunia seperti Australia, Selandia Baru, Inggris, Perancis, Jerman, Canada, Belanda, Amerika Serikat, Amerika Selatan, Rusia, India, Denmark, Pakistan, Turki, Yugoslavia, Belgia, Israel, Jepang, Afrika Selatan (Merchant and Packer, 1967; Jennings, 1970). Paratuberculosis di Indonesia pernah dilaporkan di Sumatra (Ressang, 1984).

Dari hasil pemeriksaan terhadap 60 sampel limfoglandula ilio-caecal kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Kotamadya Surabaya, diperoleh hasil 3 sampel atau

5% yang mengandung Mycobacterium paratuberculosis dari sampel yang diperiksa.

Pencegahan paratuberculosis dapat dilakukan dengan vaksinasi, hygiene dan sanitasi lingkungan yang baik serta manajemen pemeliharaan yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 1976. Paratuberculosis in Goats. Jour. Am Vet. Med. Assoc. 171 : 1254.
- Anonymous, 1976. The Oxoid Manual of Culture Ingredients and Other Laboratory Services 3rd Ed. Tonbridge Printers Ltd, England. p. 164 - 165.
- Beveridge, W.I.B, 1983. Animal Health in Australia. Volume 4. Australia Government Publishing Service Canberra . p. 165 - 170.
- Blood, D.C and Handerson, J.A, 1981. Veterinary Medicine. 5th Ed. Bailliere Tyndall, London. p. 535 - 540.
- Buchanan, R.E and Gibbons, N.E, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. p. 681 - 701.
- Cottral, G.E, 1978. Manual Standarized for Veterinary Microbiology. Comstock Publishing Associate Adivision of Cornell University Press. Ithaca and London. p. 537 - 543.
- Gilmour, N.J.L, 1976. The Pathogenesis Diagnosis and Control Johne's Disease. Vet. Res. 99 : 433 - 434.
- Gillespie, J.H and Timoney, 1981. Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animal. 7th Ed. Comstock Publishing Associate a Division of Cornell University Press. Ithaca London. p. 267 - 277.
- Jennings, A.R, 1970. Animal Pathology. 1st Ed. Bailliere Tyn-dall and Cassel Ltd, London. p. 100 - 101.

- Jensen, R, 1974. Disease of Sheep. Lea and Febrieger Phila - delphia. p. 242 - 245.
- Johnson, D.W, Muscoplat, C.C, Larsen, A.B and Thoen, C.O , 1977. Skin Testing, Fecal Cultur and Lymphocyte Immu - nostimulation in Cattle Inoculated with Mycobacterium paratuberculosis. Jour. Am. Vet. Res. 38 : 2023 - 2025.
- Joklik, K. Wolfgang, Willet. H.P, Amos, D.B, 1980. : Zinser Microbiology 17th Ed. Appleton Century Crotcs. Inc. New York. p. 651 - 698.
- Larsen, A.B, Miller, J.M and Merkal, R.S, 1977. Subcutaneous Exposure of Calves to Mycobacterium paratuberculosis Compare with Intra Venous and Oral Exposure. Jour. Am. Vet. Res. 38 : 1669 - 1671.
- Larsen, A.B, Moyle, A.I and Himes, E.M, 1978. Experimental Vaccination of Cattle Against Paratuberculosis (Joh - ne's Disease) with Killed Bacterial Vaccines : A Con - trolled Field Study. Am. Jour. Vet. Res. 39 : 65 - 69.
- Lenghaus, C, Badman, R.T and Gillick, J.E, 1977. Johne's Disease in Goat. Austral. Jour. Vet. 53 : 460.
- Merchant, I.A and Packer, R.A, 1967. Bacteriology and Viro - logy. 7th Ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 441 - 462.
- Naibaho, M, dan Soedjoko, R.B, 1981. Penuntun Praktikum Bak - teriologi. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Fakul - tas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bagian Mi - krobiologi. hal. 20 - 24.

- Ressang, A.A, 1984. Pathology Khusus Veteriner. Percetakan Bali. hal. 401.
- Schaaf, 1977. The Control of Johne's Disease. Vet. Rec . 21 : 459 - 460.
- Siegmund, O.H, 1979. The Merck Veterinary Manual. 5th Ed. Merck and Co, Inc. Rahway, N.Y, U.S.A. p. 303 - 304.
- Smith, A.H, Johnes, T.C and Hunt, R.D, 1972. Veterinary Pathology. 4th Ed. Lea and Febriger, Philadelphia . p. 637 - 639.
- Soltys, M.A, 1963. Bacteria and Fungi Pathogenic to Man and Animal. Bailliere Tyndall and Cox London. p. 126 - 131.
- Ulrich, N.A, Grumbeins and Coles, B, 1982. Paratuberculosis (Johne's Disease) in Goat. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician. 77 : 1101 - 1104.
- Wilks, C.R, Taylor, T.K and Russel, E.G, 1981. Isolation of Mycobacterium Inducing Cross Reaction in The Complement Fixation Test for Johne's Disease. Res. Vet. Sci. 30 : 323 - 327.

Bahan : Carbol. gentian violet

Saffranin

Larutan lugol sebagai oksidator

Alkohol 96% sebagai pemucat

Biakan kuman

Cara :- Buat preparat ulas dan fiksasi diatas api.

- Warnai dengan carbol gentian violet selama 3 - 5 menit.
- Tetesi larutan lugol dan biarkan selama 1 menit.
- Cuci dengan alkohol 96%.
- Cuci dengan air kran.
- Warnai dengan saffranin selama 3 menit.
- Keringkan pada kertas penghisap.
- Periksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali diberi minyak emersi.

Sumber (Naibaho dan Soedjoko, 1981).

Lampiran 2.

Pewarnaan Tahan Asam
(Metoda Ziehl Neelsen)

Bahan : Carbol fuchsin Z.N

Asam alkohol

Methylen blue dari loffler

Biakan kuman

Cara : - Buat preparat ulas.

- Warnai dengan carbol fuchsin, panasi sampai timbul uap dan biarkan selama 5 menit.
- Buang zat warna kemudian cuci dalam asam alkohol - selama 1 - 2 menit.
- Cuci dengan air sampai bersih.
- Warnai dengan methylen blue selama 1 menit.
- Cuci dengan air kran.
- Keringkan dengan kertas hisap.
- Periksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali diberi minyak emersi.

Sumber (Naibaho dan Soedjoko, 1981).

Bahan : Potassium dihydrogen phosphat	2.4	g
Magnesium sulphate	0.24	g
Magnesium citrate	0.6	g
Asparagine	3.6	g
Glycerol	12.0	ml
Potato starch	30.0	g
Fresh egg mixture	1000	ml
Malachite green	0.4	g

Cara pembuatan :

1. Lowenstein-Jensen base 56,50 gram ditambah 900 cc aquadest dan 18 cc glycerin. Dimasukkan dalam gelas erlenmeyer, di sterilkan dalam autoclave sampai 50°C selama 2 jam.
2. Telur dicuci dengan air hangat, dicuci dengan air bersih dan dikeringkan. Kemudian direndam dalam alkohol 96% selama 30 menit dan dikeringkan. Telur dipecah, dipisahkan kuning telurnya dan dimasukkan blender steril sebanyak 1000 cc.
3. Kemudian media Lowenstein-Jensen dimasukkan kedalam blender steril yang sudah berisi kuning telur dan diaduk sampai homogen. Secara steril ditambahkan malachite green 2% sedikit demi sedikit sampai bisa terlihat warna hijau.
4. Dimasukkan kedalam tabung-tabung steril yang masing-masing berisi 5 cc, kemudian diinkubasikan 80°C selama 1

jam dengan posisi miring. Kemudian di dinginkan, diinku-
basikan lagi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Sumber (Anonymous, 1976).

