

STUDI PEMBENTUKAN KEKEBALAN TERHADAP

Streptococcus pyogenes **DALAM KELINCI**



Oleh

AHDIYATNA

88 03 132

PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. terima	29 3 97
Asal dari	Fek - MIPA
Jumlahnya	1 Cap.
Harga	tidak
No. Inventaris	970204030
No. Klas	



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

1995

STUDI PEMBENTUKAN KEKEBALAN TERHADAP
Streptococcus pyogenes **DALAM KELINCI**

Oleh :

AHDIYATNA

88 03 132

Skripsi untuk melengkapi tugas dan
memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar sarjana

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN

1995

STUDI PEMBENTUKAN KEKEBALAN TERHADAP
***Streptococcus pyogenes* DALAM KELINCI**

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



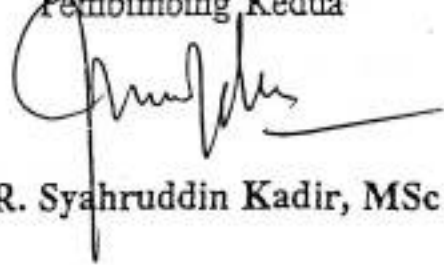
(Drs. Hasyim Bariun, MSi)

Pembimbing Pertama



(Drs. M. Natsir Djide, MS)

Pembimbing Kedua



(DR. Syahrudin Kadir, MSc)

Pada tanggal : 12 APR 1995

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang merupakan salah satu syarat wajib bagi setiap mahasiswa Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam untuk memperoleh gelar kesarjanaan.

Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada pembimbing :

1. Bapak Drs. Hasyim Bariun, MSi selaku pembimbing utama
2. Bapak Drs. M. Natsir Djide, MS selaku pembimbing pertama
ma
3. Bapak DR. Syahrudin Kadir, MSc selaku pembimbing kedua
Yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan bimbingan, petunjuk dan saran-saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Demikian pula penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan kepada :

1. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
2. Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
3. Kepala Laboratorium Farmasetika-Mikrobiologi Farmasi dan Kepala Laboratorium Biofarmasetika Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.



4. Bapak Drs. Soedarso selaku Penasehat Akademi yang telah banyak membantu memberikan bimbingan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Jurusan Farmasi dengan baik.
5. Bapak dan Ibu Dosen serta seluruh Staff Karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
6. Serta kepada seluruh rekan-rekan yang telah banyak memberikan bantuan baik moril maupun materil sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dan tugas akhir ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga penulis ucapkan kepada Bapak, Ibu, saudara dan seluruh keluarga serta rekan-rekan semua yang telah memberikan doa, dorongan dan bantuan yang sangat berharga hingga skripsi ini dapat dirampungkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Skripsi ini masih banyak ditemukan kekurangan-kekurangan, oleh karenanya dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran, kritik dan petunjuk dari semua pihak.

Semoga Skripsi ini bermanfaat sebagaimana adanya.

Ujung Pandang,

1995

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang potensi kekebalan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) terhadap *Streptococcus pyogenes*. Dalam penelitian ini kelinci diinfeksi dengan bakteri uji *S. pyogenes* pengenceran 10^{-5} sebanyak 2 ml secara intra peritoneal.

Pengambilan darah dilakukan sebelum diinfeksi dan setelah masa infeksi selama 14 hari, sebanyak kurang lebih 5 ml melalui vena marginalis telinga.

Pengujian serum dilakukan dengan sistem mikrotiter dengan menggunakan metode pengenceran berseri. Adanya kekebalan dari serum terhadap bakteri yang sama, diketahui dengan tidak terbentuknya kekeruhan yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri selama melewati masa inkubasi.

Berdasarkan perhitungan TCID₅₀ menunjukkan bahwa kadar serum yang dapat membunuh bakteri yang sama adalah 8,84% .

ABSTRACT



A research potency of immunity of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) toward *Streptococcus pyogenes* has been carried out. In this research the rabbit infected with bacteria tested *S. pyogenes* concentrated 10^{-5} as much as 2 ml by intra peritoneally.

Sample of blood is done before infected and after infected period about 14 days as much as moreless 5 ml from of vena marginalis of the ear.

Testing of serum is done with microtiter system with used in a series concentrated method. With precence immunity of serum toward the same of bacteria is known with there was no derived of turbidity indicated that there was no the growth of the bacteria after incubation period.

In accordance with accounted $TCID_{50}$ indicated that concentrated of serum wich could be killed the same of bacteria was 8,84 %.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABLE	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II POLA PENELITIAN	4
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	7
III.1 Uraian Bakteri Uji	7
III.1.1 Sistematika	7
III.1.2 Sifat dan Morfologi	7
III.2 Infeksi	8
III.3 Kekebalan	11
III.3.1 Defenisi	11
III.3.2 Pembentukan kekebalan	11
III.3.3 Macam-macam kekebalan	12
III.3.3.1 Kekebalan Bawaan	12
III.3.3.2 Kekebalan Didapat	13
III.4 Pemilihan Hewan Percobaan	15
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	17
IV.1 Alat-alat yang Digunakan	17
IV.2 Bahan-bahan yang Digunakan	18

IV.3	Sumber Mikroorganisme	18
IV.4	Sterilisasi Alat dan Bahan	18
IV.5	Pembuatan Medium NA, NB dan Penyiapan Biakan Bakteri	19
IV.5.1	Pembuatan Medium Nutrient Agar	19
IV.5.2	Pembuatan Medium Nutrient Broth	19
IV.5.3	Penyiapan Biakan Bakteri	20
IV.6	Seleksi Hewan Percobaan	20
IV.7	Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan.....	20
IV.8	Pengujian Serum Darah	20
BAB V	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	22
V.1	Hasil Penelitian	22
V.2	Pembahasan	24
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	25
VI.1	Kesimpulan	25
VI.2	Saran	25
DAFTAR	PUSTAKA	26

DAFTAR GAMBAR



Halaman

I. Hasil pengamatan kekeruhan pada plat mikrotiter terhadap *S. pyrogenes* setelah inkubasi 1 X 24 jam dari serum kelinci normal 29

II. Pengamatan kekeruhan pada plat mikrotiter terhadap *S. pyrogenes* setelah inkubasi 1 X 24 jam dari serum kelinci yang terinfeksi 30

DAFTAR TABEL

Halaman

I. Hasil pengamatan jumlah kekeruhan pada plat mikrotiter terhadap <i>S.pyogenes</i> setelah masa inkubasi 1 X 24 jam dari serum kelinci yang terinfeksi	28
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Pembuatan medium NA dan penyiapan biakan mikroba ..	31
B. Pembuatan medium NB dan perhitungan jumlah bakteri..	32
C. Perhitungan TCID ₅₀	33
D. Komposisi dan pembuatan pembedihan bakteri	34
E. Perhitungan TCID ₅₀ dari hasil pengamatan jumlah ke- keruhan pada plat mikrotiter terhadap <i>S.pyogenes</i> ..	35
F. Tabel parameter kelinci sehat dan kelinci yang ter- infeksi	36

BAB I

PENDAHULUAN

Pengetahuan tentang imunologi yang maju telah dapat dikembangkan untuk menegakkan diagnosis berbagai penyakit. Selanjutnya, kemajuan dalam teknik imunologi digunakan untuk memperbaiki fungsi sistem imun dalam memerangi infeksi. Sistem imun yang berfungsi baik mutlak diperlukan untuk kelangsungan hidup seseorang (1).

Perkembangan penyakit infeksi dewasa ini telah meluas, dan jumlah penderitanya terus meningkat, dimana dengan adanya bakteri tersebut dapat menimbulkan macetnya respon imun pada penderita defisiensi imun (2).

Infeksi merupakan suatu proses masuknya mikroba atau parasit ke dalam jaringan, sehingga mengakibatkan suatu perubahan-perubahan setempat dan sistemik dalam tubuh inang. Karena mikroba dan parasit tersebut merupakan konfigurasi asing bagi tubuh, maka infeksi menimbulkan respon imun (2).

Keutuhan tubuh dipertahankan oleh sistem pertahanan tubuh yang terdiri atas sistem imun nonspesifik dan spesifik. Sistem imun nonspesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena dapat memberikan respon langsung terhadap antigen, sedang sistem imun spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum dapat memberikan responnya (1).

Berdasarkan kenyataan bahwa sistem imun dapat membentuk antibodi terhadap antigen tertentu, maka penetapan antibodi terhadap bakteri, virus, jamur atau parasit dalam serum dapat dipakai untuk menunjang diagnosis infeksi dengan mikroorganisme bersangkutan (3).

Streptococcus pyogenes adalah salah satu jenis mikroba yang banyak terdapat di alam, dan bersifat patogen. Berdasarkan sifat antigeniknya *Streptococcus pyogenes* mempunyai antigen polisakarida yang terdapat pada dinding selnya (4).

Streptococcus pyogenes menyebabkan 90 - 95 % dari semua infeksi streptococcus pada manusia. Infeksi ini disebabkan oleh bakteri anaerob yang berasal dari mulut dan alat pernafasan (4,9).

Dalam perkembangan laboratorium imunologi dewasa ini sering digunakan hewan percobaan untuk menentukan diagnosis suatu penyakit infeksi. Dengan demikian akan dapat dilihat bagaimana tubuh hewan percobaan tersebut menjadi kebal terhadap infeksi mikroba. Disamping itu, dapat pula diamati bahwa hewan percobaan yang telah terinfeksi dapat pulih kembali, karena telah terbentuk kekebalan yang disebabkan oleh mikroba tersebut.

Permasalahan : apakah dalam tubuh hewan percobaan yang telah terinfeksi oleh *Streptococcus pyogenes* dapat terbentuk kekebalan terhadap bakteri *S. pyogenes* dalam kelinci. Suspensi biakan *S. pyogenes* disuntikkan ke dalam

tubuh kelinci secara intraperitoneal. Dan untuk mengetahui potensi dilakukan dengan menghitung dosis infeksi biakan jaringan (TCID₅₀) dari serum darah hewan percobaan terhadap *S.pyogenes*.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui kekebalan yang ditimbulkan oleh hewan percobaan setelah penyuntikan dengan bakteri uji *S.pyogenes* dengan tujuan dapat memberikan informasi mengenai cara mengetahui bakteri penyebab kekebalan dengan menggunakan serum hewan uji yang telah dikebalikan dengan bakteri yang sama.

BAB II
POLA PENELITIAN



II.1 Penyiapan Alat dan Bahan Penelitian

II.1.1 Penyiapan Alat

Alat-alat yang digunakan disiapkan sesuai dengan kebutuhan penelitian.

II.1.2 Penyiapan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan yang memenuhi persyaratan.

II.2 Sumber Mikroorganisme

Bakteri *Streptococcus pyogenes* diperoleh dari koleksi Mikrobiologi Farmasi, Laboratorium Farmasetika Jurusan Farmasi, Fakultas matematika dan Ilmu pengetahuan Alam.

II.3 Sterilisasi Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan Bahan yang digunakan disterilkan sesuai dengan petunjuk dan cara-cara yang disyaratkan.

II.4 Pembuatan Medium Nutrient Agar, Nutrient Broth dan Penyiapan Biakan Bakteri.

II.4.1 Pembuatan Medium Nutrient Agar

II.4.2 Pembuatan Medium Nutrient Broth

II.4.3 Penyiapan Biakan Bakteri

II.5 Seleksi Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah Kelinci jantan, dewasa yang diperoleh dari peternak kelinci di Balla parang ujung Pandang.

II.6 Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan

Kelinci disuntik dengan hasil pengenceran dari suspensi biakan *Streptococcus pyogenes* secara intra peritoneal dengan dosis tertentu. Setelah melewati masa infeksi diambil darahnya melalui vena marginalis telinga.

II.7 Pengujian Serum Darah

Serum darah yang telah diambil dari vena marginalis telinga kelinci diuji dengan menggunakan alat mikrotiter.

II.8 Pengamatan dan Pengumpulan Data

Data diamati dari kekeruhan yang timbul pada tiap lubang mikrotiter.

II.9 Analisis Data

Data dianalisis dengan menghitung dosis infeksi biakan jaringan (TCID₅₀).

II.10 Pembahasan Hasil

Pembahasan dilakukan sesuai dengan pengamatan dan analisis data.

II.11 Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil pembahasan dan analisis data hasil penelitian.

BAB III
TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Uraian Bakteri Uji

III.1.1 Sistematika (6)

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Streptococcaceae
Marga	: Streptococcus
Jenis	: <i>Streptococcus pyogenes</i>

III.1.2 Sifat dan Morfologi (4,12,15,16)

Streptococcus adalah mikroba bersifat gram positif, bentuk kokus dengan penataan tunggal, berpasangan atau berantai. Lazimnya bersifat anaerob dan fermentatif. Mikroba ini banyak ditemukan di alam dan juga sebagai mikroba komensal pada hewan. Streptococcus yang bersifat patogen dan nonpatogen dapat ditemukan pada kulit, mukosa membran, traktus genitalis dan saluran pencernaan.

Streptococcus adalah mikroorganisme berbentuk bulat, tersusun secara karakteristik dalam bentuk rantai, tersebar luas di alam dan beberapa terdapat sebagai flora normal pada manusia.

Streptococcus pyogenes adalah bakteri gram positif, mempunyai dinding sel mukokompleks yang disertai oleh polisakarida sederhana dan juga oleh suatu jenis polimer lain yang dikenal sebagai asam teikhoat, yang terdiri atas ester fosfat gula alkohol yang dibangun menjadi suatu polimer bersama-sama dengan glukosa dan asam amino alanin.

Beberapa streptococcus mempunyai kapsul polisakarida, terutama pada streptococcus grup A, B dan C membentuk kapsul yang tersusun dari asam hialuronik. Dinding sel streptococcus mengandung protein M, T, R sebagai antigen, karbohidrat dan peptidoglikan.

Berdasarkan pembagian menurut Lancefield yang dilakukan dengan uji presipitasi berdasarkan sifat antigeniknya, *S.pyogenes* mengandung protein M sebagai antigen polisakarida yang didapatkan pada dinding selnya.

III.2 Infeksi (2,13)

Infeksi bakteri pada manusia memberikan gambaran paling baik mekanisme yang terlibat pada hubungan parasit hospes, yang hasilnya ditentukan oleh bantuan genetik hospes dan kemampuan genetik

bakteri. Bakteri memiliki tingkat variabilitas yang sangat luas dan mempunyai kesanggupan beradaptasi yang besar melalui mekanisme seperti mutasi perubahan metabolik yang terjadinya dirangsang oleh perubahan lingkungan, lisogenisasi dengan bakteriofage, produksi toksin dan kemampuan untuk memperpanjang kelangsungan hidup (sporulasi). Respons-respons kompleks dari bakteri patogen sedemikian dilengkapi dengan kompleks yang sama dan berbagai macam respons imun pada manusia.



Dikenal tiga golongan besar infeksi bakteri yaitu :

1. Infeksi akut atau jenis infeksi yang sangat produktif.
2. Infeksi kronik, yang menunjukkan kemampuan bakteri tertentu, misalnya parasit intraseluler, untuk membangun parasitisme intraseluler.
3. Infeksi toksigenik atau infeksi jenis penghasil toksin.

Infeksi merupakan suatu proses invasi oleh mikroba atau parasit kedalam jaringan sehingga mengakibatkan suatu perubahan-perubahan setempat dan sistemik dalam tubuh inang. Karena mikroba dan parasit tersebut merupakan konfigurasi asing bagi tubuh (inang), maka infeksi dapat membangkitkan respon imun yang pada dasarnya tidak jauh beda

dengan apabila tubuh menghadapi konfigurasi asing lainnya.

III.3 Kekebalan

III.3.1 Definisi (13)

Dalam penggunaan secara klasik, kekebalan diartikan sebagai daya tahan relatif hospes terhadap reinfeksi mikroba tertentu.

Definisi kekebalan masa kini mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu hospes mengenal benda-benda asing pada dirinya, untuk menetralkan, menyisihkan atau memetabolisme benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri.

III.3.2 Pembentukan Kekebalan (15,16,19)

Inti pembentukan kekebalan adalah ingatan (memory), kekhususan atau spesifitas dan pengenalan zat asing. Pandangan ini diperoleh berdasarkan hasil pengalaman bahwa kontak dengan berbagai jenis penyakit infeksi kemudian akan memberikan kekebalan terhadap penyakit-penyakit itu. kontak pertama tubuh dengan suatu jasad penyebab infeksi jelas telah meninggalkan suatu kesan, memberikan ingatan, sehingga tubuh

tersebut siap sedia untuk menolak setiap serangan berikut dari jasad itu.

Semua vertebrata mampu memberikan tanggapan dan menolak benda-benda asing karena memiliki sel-sel khusus yang bertugas untuk mengenali dan membedakan apakah konfigurasi itu asing atau milik sendiri. Sel-sel khusus yang dimaksud adalah limfosit yang merupakan sel yang imunokompeten dalam sistem imun.

Tubuh mempunyai dua sistem dasar pertahanan tubuh :

1. Humoral; imunitas humoral adalah imunitas yang disebabkan antibodi yang beredar dalam fraksi gama-globulin protein plasma. Imunitas humoral adalah pertahanan utama terhadap infeksi bakteri.
2. Seluler; sebagian diperantarai oleh produk-produk limfosit dengan berat molekul besar yang dinamakan limfokisne. Imunitas seluler menyusun pertahanan utama terhadap infeksi yang disebabkan oleh virus, jamur dan beberapa bakteri seperti basil tuberkolosis.

III.3.3 Macam-macam Kekebalan (1,14)

III.3.3.1 Kekebalan Bawaan

Tubuh mempunyai kemampuan

untuk melawan hampir semua jenis organisme atau toksin yang cenderung merusak organ atau jaringan. Kekebalan bawaan dapat terjadi oleh proses seperti :

1. Fagositosis bakteri dan penyerang lain oleh sel darah putih dan sel dari sistem makrofag jaringan.
2. Destruksi organisme yang tertelan dalam lambung oleh enzim-enzim pencernaan.
3. Daya tahan kulit terhadap invasi oleh organisme.
4. Adanya senyawa kimia tertentu dalam darah yang menyerang organisme asing atau toksin dan menghancurkannya.

Kekebalan bawaan ini membuat tubuh manusia resisten terhadap penyakit-penyakit.

Kekebalan bawaan atau alamiah terbagi atas :

1. Kekebalan bawaan pasif :

Ialah pemindahan antibodi

atau sel darah putih yang disensitisasi dari badan sel orang yang imun ke nonimun.



2. Kekebalan bawaan aktif :

Dapat terjadi bila suatu organisme secara alamiah masuk ke dalam tubuh dan menimbulkan pembentukan antibodi atau sel yang tersensitisasi.

III.3.3.2 Kekebalan didapat (Adaptif)

Selain kekebalan bawaan, tubuh manusia juga mempunyai kemampuan membentuk kekebalan spesifik yang sangat kuat terhadap tiap-tiap agen penginvasi seperti bakteri yang menatikan, virus, toksin. Kekebalan ini dinamakan kekebalan didapat atau kekebalan adaptif.

Sistem kekebalan didapat ini penting sebagai pertahanan terhadap organisme yang menginvasi, karena tubuh tidak mempunyai kekebalan bawaan atau kekebalan ilmiah. Tubuh tidak

menghambat invasi pada serangan pertama akan tetapi dalam beberapa hari sampai beberapa minggu setelah terpapar, sistem imun khusus timbul dengan kuat untuk menahan penguvasi. Selanjutnya, timbul daya tahan sangat spesifik untuk penguvasi tertentu dan tidak untuk penguvasi lainnya.

Kekebalan didapat terbagi atas :

1. Kekebalan didapat pasif,

Kekebalan didapat pasif dilakukan dengan memberikan serum, antibodi, antitoksin pada penderita defisiensi imun atau pemberian sel yang sudah disensitisasi.

2. Kekebalan didapat aktif,

Kekebalan didapat aktif dapat ditimbulkan dengan vaksinasi, antigen mikroorganisme baik yang mati maupun yang hidup dan telah dilemahkan.

III.4 Pemilihan Hewan Percobaan (17)

Pemanfaatan hewan percobaan menurut pengertian secara umum ialah untuk penelitian yang berdasarkan kepada pengamatan aktivitas biologik. Sebagai hewan percobaan sering digunakan kelinci, mencit, marmot dan tikus. Pemilihan hewan percobaan disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan.

Dalam bidang imunologi digunakan hewan percobaan yang dapat memberikan respons imunologik dengan variasi seminimal mungkin.

Dalam penelitian ini digunakan hewan percobaan kelinci. Sebagai agen penyebab adalah streptococcus dimana streptococcus grup A dapat memberikan respon imun terhadap species kelinci. Digunakan hewan percobaan kelinci jantan dan berbadan sehat. Pemeliharaan kesehatan hewan percobaan merupakan suatu rangkaian tindakan yang saling mempengaruhi, terdiri dari cara pemeliharaan, pencegahan penyakit dan sanitasi lingkungan. Faktor-faktor yang penting dalam cara pemeliharaan adalah meliputi :

- Bangunan kandang harus direncanakan dengan baik sehingga memberikan kenyamanan hidup bagi hewan.
- Makanan; hewan percobaan membutuhkan makanan bergizi dalam jumlah yang cukup, segar dan bersih.

- Pencegahan penyakit
- Sanitasi lingkungan, merupakan kunci keberhasilan dalam pemeliharaan hewan percobaan.

BAB IV
METODOLOGI PENELITIAN

IV.1 Alat-alat yang digunakan :

1. Cawan petri
2. Centrifuge (PORTA)
3. Gelas ukur (PYREX)
4. Gelas piala (PYREX)
5. Inkubator (HEMMERT)
6. Jarum suntik
7. Jarum Ose
8. Kompor gas (RINNAI)
9. Labu Erlenmeyer (PYREX)
10. Laminar Air Flow (ENVIRCO)
11. Lemari pendingin (HITACHI)
12. Lampu spiritus
13. Mikrodiluter dengan volume 50 μ l (Dynatech Laboratories Inc.)
14. Mikropipet dengan volume 50 μ l (Dynatech Laboratories Inc.)
15. Mikrotiter (Dynatech Laboratories Inc.)
16. Otoklaf (PORTABLE)
17. Oven (ELECTROLUX)
18. Tabung reaksi
19. Timbangan gram (OHAUS)

IV.2 Bahan-bahan yang digunakan :

1. Air suling
2. Alkohol 70 %
3. Medium Nutrient Agar
4. Medium Nutrient Broth
5. Larutan Natrium klorida fisiologis

IV.3 Sumber Mikroorganisme

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari koleksi Mikrobiologi Farmasi, Laboratorium Farmasetika Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Biakan bakteri dipelihara pada medium agar miring Nutrient Agar.

IV.4 Sterilisasi Alat dan Bahan (6,8,9,18)

Alat-alat gelas yang diperlukan dicuci dengan larutan detergen panas, setelah dingin disikat sampai bersih lalu dibilas dengan air. Selanjutnya direndam di dalam larutan HCl 1% selama 16 - 24 jam, dibilas kembali dengan air suling lalu dikeringkan.

Alat-alat yang terbuat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu 160° C selama 2 jam, sedang alat yang terbuat dari platina (Jarum inokulasi) disterilkan menggunakan api langsung hingga memijar. Sterilisasi plat mikrotiter dengan merendam dalam



larutan formalin 10 % selama kurang lebih
Medium yang digunakan yaitu medium nutrient
dan nutrient broth disterilkan dalam otoklaf pada
suhu 121° C selama 15 menit.

IV.5 Pembuatan Medium Nutrient Agar, Nutrient Broth dan Penyiapan Biakan Bakteri

IV.5.1 Pembuatan Medium Nutrient Agar (7)

Ditimbang ekstrak beef sebanyak 3 gram, pepton 5 gram dan agar 15 gram. Ekstrak beef dilarutkan dalam air suling ditambahkan pepton dan agar lalu dipanaskan hingga larut. Didinginkan hingga suhu 45° C, kemudian diukur pH pada pH 6-7 dan selanjutnya volumenya dicukupkan hingga 1000 ml dengan air suling. Medium tersebut dimasukkan dalam Erlenmeyer lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

IV.5.2 Pembuatan Medium Nutrient Broth (7)

Ditimbang ekstrak beef 3 gram dan pepton 5 gram. Ekstrak beef dan pepton dilarutkan dalam air suling, kemudian diukur pH pada pH 6-7 lalu volumenya dicukupkan hingga 1000 ml dengan air suling. Medium dimasukkan dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

IV.5.3 Penyiapan Biakan Bakteri (6)

Dengan menggunakan jarum inokulasi steril, sejumlah biakan murni diinokulasikan pada medium miring nutrient agar lalu diinkubasikan pada suhu 37° C selama 1 kali 24 jam.

IV.6 Seleksi Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan, sehat, dewasa dengan berat badan 1,5 - 2 kg yang diperoleh dari peternak kelinci Di Balla Parang Ujung Pandang.

IV.7 Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan

Kelinci digunakan 3 ekor, sebelum diinfeksi dengan *Streptococcus pyogenes*, diambil darahnya kurang lebih 5 ml melalui vena marginalis telinga sebagai kontrol. Kemudian ketiga kelinci disuntikkan *S.pyogenes* pengenceran 10^{-5} sebanyak 2 ml secara intra peritoneal. Selanjutnya kelinci terinfeksi dibiarkan sampai sehat kembali.

IV.8 Pengujian Serum Darah

Kelinci yang telah sehat kembali, diambil darahnya kurang lebih 5 ml melalui vena marginalis telinga lalu disentrifus sampai serumnya terpisah.

Serum terpisah dimasukkan ke dalam lubang mikrotiter pada kolom A dari baris 1 sampai 10 masing-masing sebanyak 50 μ l. Pada kolom B sampai H baris 1 sampai 12 diisi larutan Natrium fisiologis sebanyak 50 μ l. Kolom B baris 1 sampai 10 diisi serum sebanyak 50 μ l, kemudian dari kolom B diambil sebanyak 50 μ l dan dimasukkan pada kolom C, demikian seterusnya sampai kolom H. Kemudian semua lubang pada kolom A sampai H dari baris 1 sampai 12 diisi dengan *Streptococcus pyogenes* hasil pengenceran menggunakan nutrient broth 10^{-5} sebanyak 50 μ l, kecuali baris 11 sebagai kontrol sterilitas diisi dengan nutrient broth sebanyak 50 μ l. Lalu diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37° C.

Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan pada masa inkubasi 24 dan 48 jam. Bila tidak ada pertumbuhan bakteri maka massa dalam lubang kelihatan jernih seperti pada kontrol sterilitas dibaris 11, sedangkan apabila ada pertumbuhan akan keruh seperti kekeruhan pada kontrol pertumbuhan dibaris ke-12. jumlah lubang yang tidak mengalami pertumbuhan bakteri (negatif) tiap kolom dicatat.

BAB V
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN



V.1 Hasil Penelitian

1. Pada penelitian ini dilakukan penyuntikan terhadap 3 ekor kelinci jantan, sehat, dewasa dengan berat badan 1,5 - 2 kg masing-masing dengan pengenceran 10^{-5} dari suspensi biakan *Streptococcus pyogenes* secara intra peritoneal. Berdasarkan hasil pengamatan, dari ketiga kelinci tersebut hanya satu ekor yang terinfeksi, maka dilakukan pengujian serum hanya pada kelinci yang telah terinfeksi meskipun pada pengerjaan kontrol menunjukkan bahwa ketiga kelinci tidak mempunyai kekebalan terhadap bakteri uji (gambar 1 dan 2).
2. Hasil pengujian serum dengan sistem mikrotiter adalah sebagai berikut :
Pada kolom A, B dan C baris 1 sampai 10 tidak menampakkan adanya pertumbuhan bakteri, ditandai dengan tidak terbentuknya kekeruhan. Dengan kata lain pada tiap lubang mikrotiter tetap jernih setelah melewati masa inkubasi. Pada Kolom D baris ke-1 dan 2 nampak adanya kekeruhan yang menandakan ada pertumbuhan bakteri, demikian pula pada baris ke-9 dan 10. Pada kolom E, kekeruhan nampak pada

baris ke-1, 2, 3, 8, 9 dan 10. Dan pada kolom F, G dan H pada baris ke-1 sampai 10 telah terjadi kekeruhan pada semua lubang mikrotiter setelah melewati masa inkubasi (Gambar 2).

V.2 Pembahasan

Pada penelitian tentang pembentukan kekebalan terhadap *Streptococcus Pyogenes* dalam kelinci ini dilakukan pengujian serum dari kelinci yang telah dikebalkan dengan bakteri uji. Jadi serum hanya diambil dari kelinci yang telah mengalami infeksi dan dapat sembuh kembali terhadap bakteri uji. Disini digunakan 3 ekor kelinci, dari ke-3 ekor kelinci tersebut hanya 1 ekor yang dapat terinfeksi oleh bakteri uji. Hal ini dapat disebabkan karena sistem kekebalan dari tiap-tiap kelinci tidak sama, atau dapat juga disebabkan jumlah bakteri yang disuntikkan tidak cukup untuk menyebabkan infeksi. Untuk dapat membedakan kelinci yang telah terinfeksi dan kelinci yang sehat dapat dilakukan dengan melihat perbandingan berdasarkan beberapa parameter (lampiran F).

Dari hasil pengujian serum dan analisis data diperoleh pada kadar serum 100 % dari seluruh perlakuan dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji demikian pula pada pengenceran serum 50 % dan 25 % tidak menampakkan adanya pertumbuhan bakteri uji. Jadi pada kadar serum 100 % sampai pengenceran 25 %,

menunjukkan serum mempunyai kemampuan membunuh bakteri uji yang sama. Sedang pada pengenceran sampai kadar serum 12,5 % dan 6,25 % mulai menampakkan adanya pertumbuhan dari bakteri uji, dan pada pengenceran sampai kadar serum 3,12%, 1,56 % dan 0,78 % serum tidak mampu lagi menghambat pertumbuhan bakteri uji, dengan kata lain serum tidak mampu lagi membunuh bakteri yang sama. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi pengenceran serum makin kurang kekuatan serum tersebut untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji. Semakin berkurangnya kadar serum berarti semakin berkurang zat penolak yang dibutuhkan untuk memberikan efek menghambat pertumbuhan bakteri yang sama.

Dengan perhitungan $TCID_{50}$ potensi serum untuk membunuh bakteri diperoleh pada hasil pengenceran dengan kadar serum 8,84 % (lihat lampiran).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan yang diperoleh setelah dilakukan penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Penyuntikkan suspensi biakan *Streptococcus pyogenes* pengenceran 10^{-5} pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dapat menginfeksi dan memberikan kekebalan terhadap bakteri yang sama.
2. Dengan perhitungan TCID₅₀ potensi serum untuk membunuh bakteri diperoleh pada hasil pengenceran dengan kadar serum 8,84 %.

VI.2 Saran

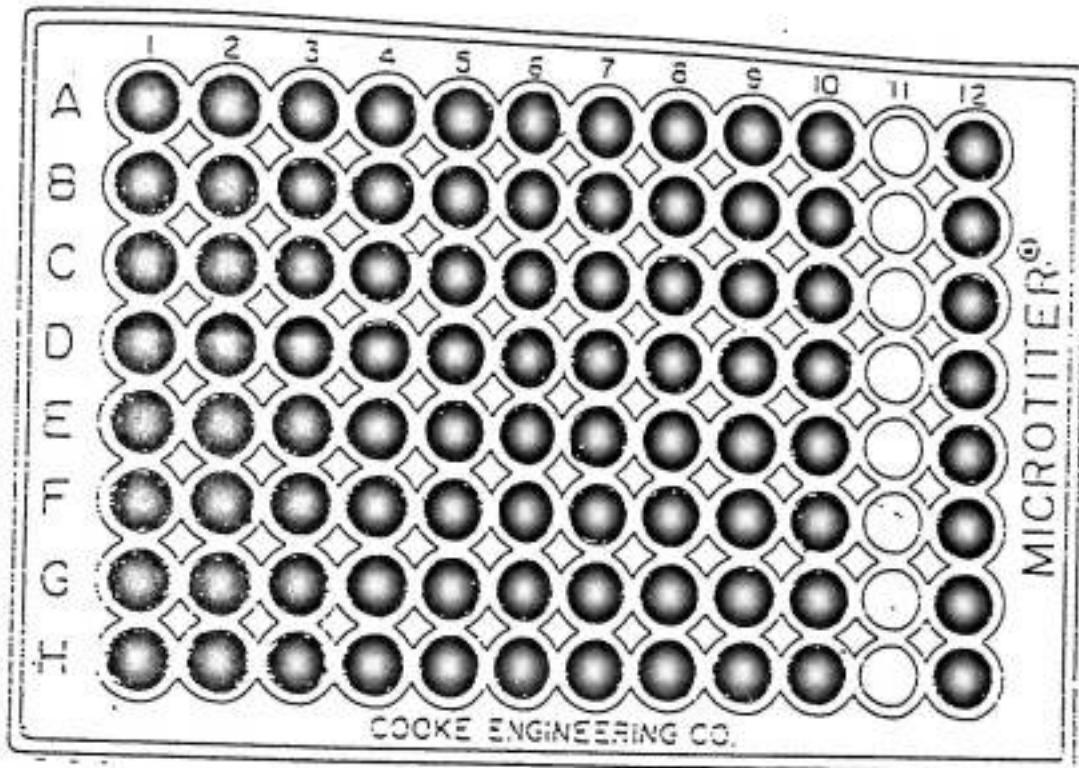
Disarankan untuk melakukan penelitian yang sama untuk mengetahui sejauh mana waktu kekebalan dapat berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaya, K.G., (1988), "Imunologi Dasar", Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 2,3.
2. Subowo, (1993), "Imunologi Klinik", Cetakan Ke-10, Penerbit Angkasa Bandung, 100,123.
3. Kresno, S.B., (1991), "Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium", Edisi II, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 3, 158.
4. Lay, B.W., (1992), "Mikrobiologi", Edisi I, Rajawali Pers, Jakarta, 285, 286.
5. Suriawiria, U., (1986), "Pengantar Mikrobiologi Umum", Penerbit Angkasa Bandung, 211.
6. Dwidjoseputro, D. (1987), "Dasar-dasar Mikrobiologi", Penerbit Djambatan Malang, 36-47.
7. Difco Manual, (1984), "Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology", Tenth Edition, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA, 619.
8. Djide, M.N., dan Gobel, R.B., (1990), "Metode Instrumental dalam Mikrobiologi Umum", Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, 4, 8.
9. Conrath, T.B., (ed.), (1972), "Handbook of Microtiter Procedure", Dynatech Corporation, Cambridge, 2, 3, 93.
10. Stewart, F.S., dan Beswick, T.S.L. (1977), "Bacteriology, Virologi And Immunity For Student Of Medicine", Tenth Edition, The English Language Book Sociaty and Balliere Tindall, London, 212-219.

Tabel I. Hasil pengamatan jumlah kekeruhan pada plat mikrotiter terhadap *S.pyogenes* setelah masa inkubasi 1 X 24 jam.

Kadar serum (%)	Jumlah Perlakuan = n	Jumlah Mati = E	$P_i = \frac{E}{n}$
100,00	10	10	1,0
50,00	10	10	1,0
25,00	10	10	1,0
12,50	10	6	0,6
6,25	10	4	0,4
3,13	10	0	0,0
1,56	10	0	0,0
0,78	10	0	0,0



Gambar I. Hasil penganatan kekeruhan pada plat mikrotiter terhadap *S. pyogenes* setelah inkubasi 1 X 24 jam dari serum kelinci normal sebagai kontrol.

Keterangan :

Kadar Serum pada tiap kolom :

A = 100% E = 6,25 %

B = 50% F = 3,13 %

C = 25% G = 1,56 %

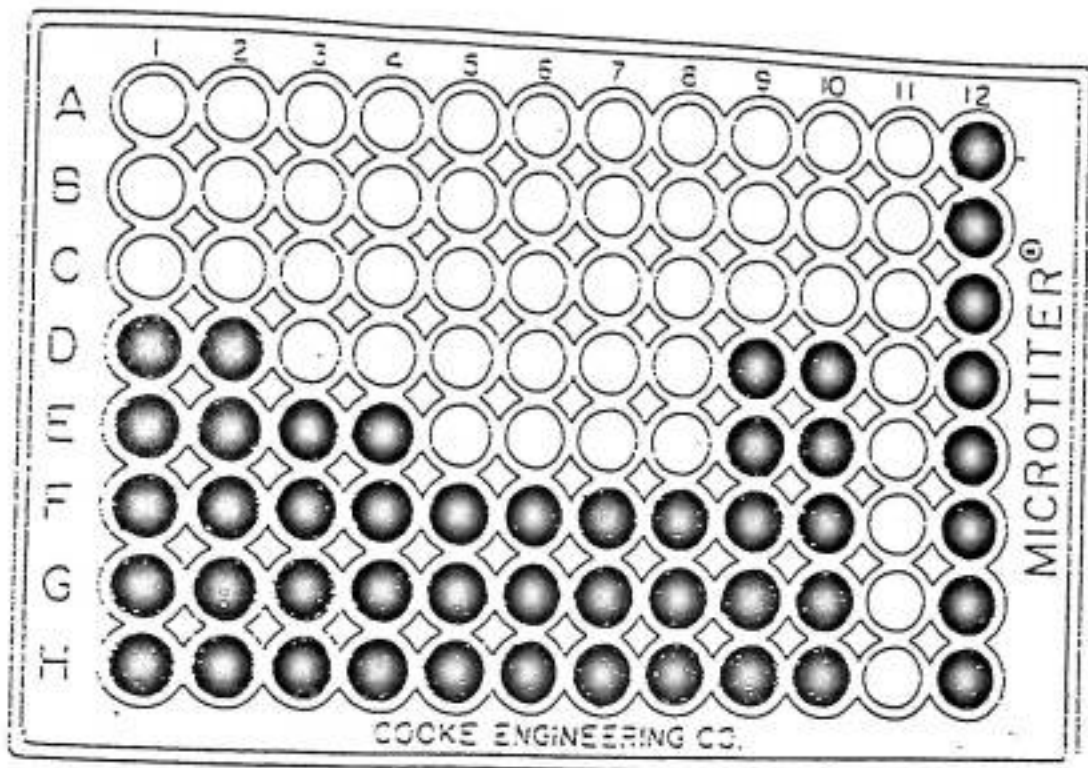
D = 12,5% H = 0,78 %

● = Ada pertumbuhan
Bakteri

○ = Tidak ada Per-
tumbuhan bakteri

Hasil perhitungan diperoleh tidak ada potensi serum kelinci yang normal

TCID50 serum normal = 0 %



Gambar II. Hasil pengamatan kekeruhan pada plat mikro-titer terhadap *S. pyogenes* setelah inkubasi 1 X 24 jam.

Keterangan :

Kadar Serum pada tiap kolom :

A = 100% E = 6,25 %

B = 50% F = 3,12 %

C = 25% G = 1,56 %

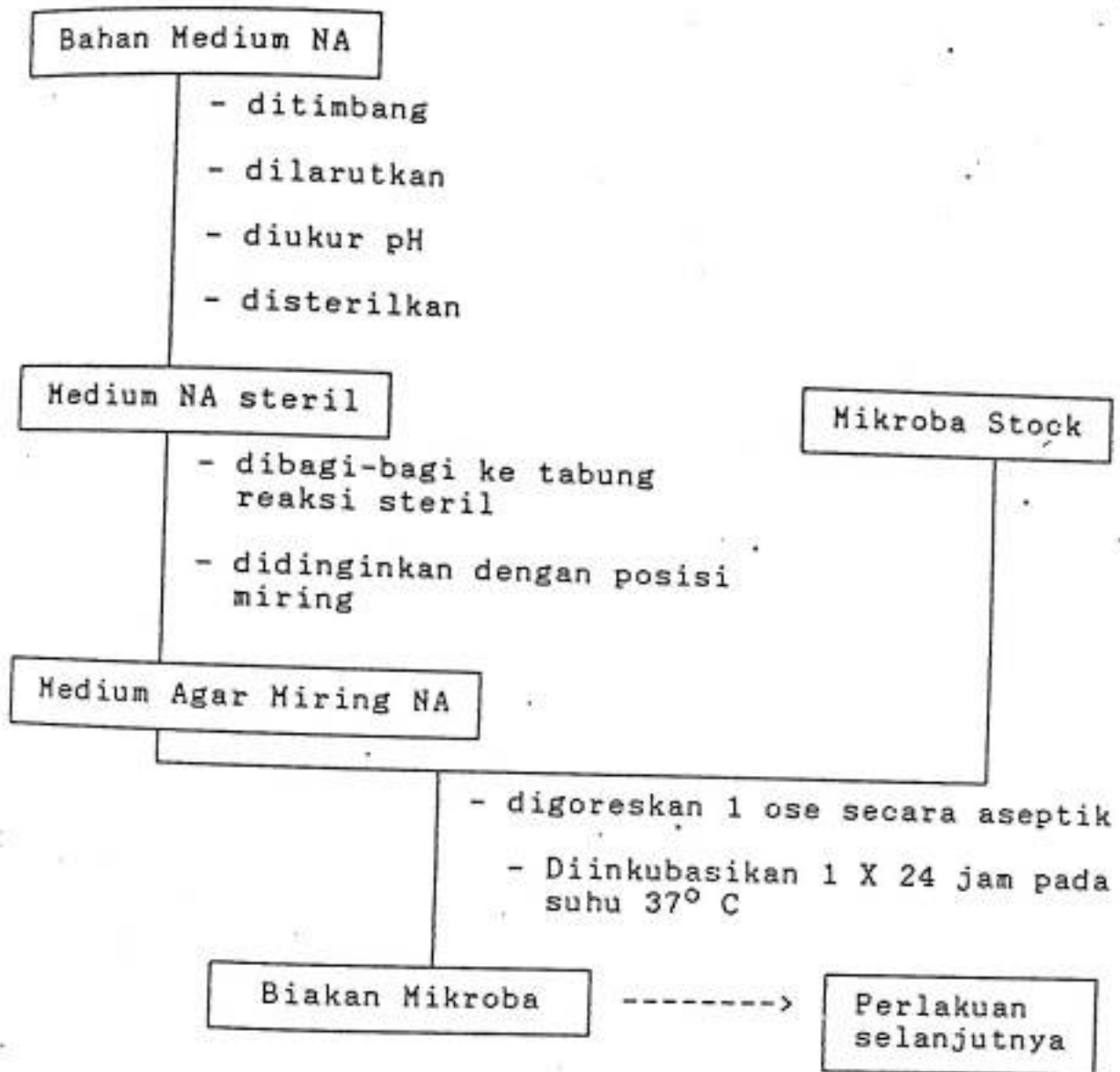
D = 12,5% H = 0,78 %

● = Ada pertumbuhan
Bakteri

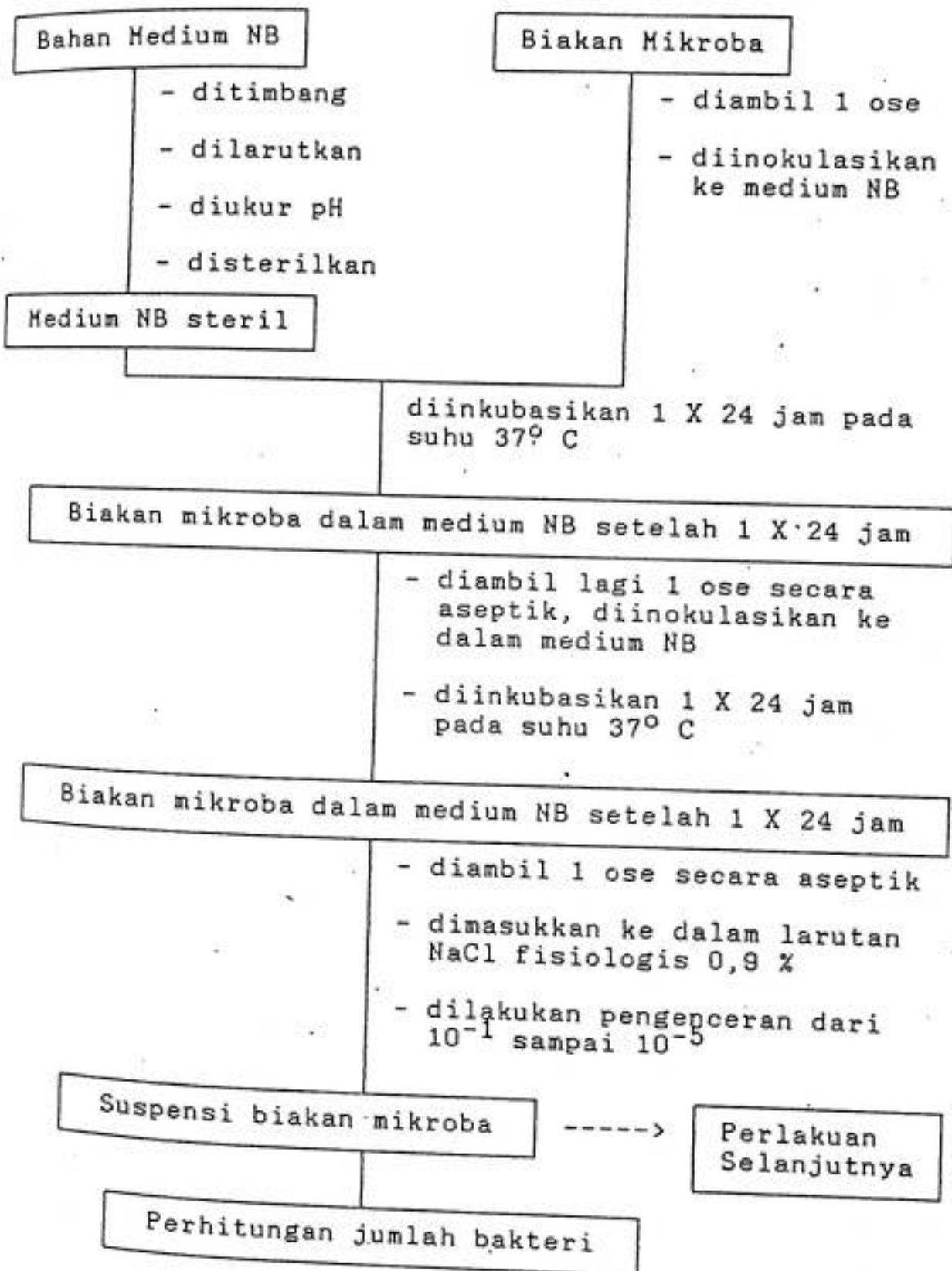
○ = Tidak ada Per-
tumbuhan bakteri

Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran E

Lampiran A. PEMBUATAN MEDIUM NA DAN PENYIAPAN BIAKAN MIKROBA



Lampiran B. PEMBUATAN MEDIUM NB DAN PERHITUNGAN JUMLAH BAKTERI



Lampiran D. KOMPOSISI DAN PEMBUATAN PERBENIHAN BAKTERI

1. Perbenihan Cair ("Nutrient Broth") *

terdiri dari :

Ekstrak beef 3 gram

Pepton 5 gram

Air suling ad 1000 ml

Bahan-bahan ditimbang dan dilarutkan dalam air suling, lalu volumenya dicukupkan hingga 1000 ml dengan air suling. Medium dimasukkan dalam Erlenmeyer dan di-sterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Perbenihan Agar ("Nutrient Agar") *

terdiri dari :

Ekstrak beef 3 gram

Pepton 5 gram

Agar 15 gram

Air suling ad 1000 ml

Bahan-bahan ditimbang dan dilarutkan dalam air suling, kemudian dipanaskan sampai semua bahan larut. Didinginkan hingga suhu 45°C kemudian volumenya dicukupkan hingga 1000 ml dengan air suling. Medium di-sterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

* Pustaka 7

Lampiran E. PERHITUNGAN TCID50 DARI HASIL PENGAMATAN JUMLAH
KEKERUHAN PADA PLAT MIKROTITER TERHADAP
S. pyogenes

Kadar serum (%)	Jumlah Perlakuan = n	Jumlah Mati = E	Pi = $\frac{E}{n}$
25,00	10	10	1,0
12,50	10	6	0,6
6,25	10	4	0,4
3,125	10	0	0,0

Rumus Perhitungan TCID50 dalam % = antilog m

$$m = \log D_{\max} + \frac{\log d}{2} - \log d \sum E_i$$

D_{\max} = Batas atas kadar serum yang memberikan efek
terhadap seluruh perlakuan yaitu 25 %

d = Faktor pengenceran adalah 2

$\sum E_i$ = 1,0; 0,6; 0,4; dan 0,0 -----Epi

m = Persentase respon hewan percobaan terhadap dosis
yang diberikan

Jadi

$$m = \log 25 + \frac{\log 2}{2} - \log 2 \times 2$$

$$m = 1,39794 + 0,1505 - 0,30103 \times 2$$

$$m = 1,39794 + 0,1505 - 0,60206$$

$$m = 1,54844 - 0,60206$$

$$= 0,94638$$

$$\text{antilog } 0,94638 = 8,84 \%$$

Lampiran F. TABEL PARAMETER KELINCI YANG SEHAT DAN
KELINCI YANG TERINFEKSI *S.pyogenes*

Parameter	Sehat	Sakit *
1. Suhu tubuh	38° C	39° C.
2. Gerak-gerak	aktif	tidak aktif
3. Nafsu makan	baik, 5 g/100 g BB perhari	kehilangan / nafsu makan berkurang.
4. Penampakan mata dan bulu	mata cerah dan bulu halus	bulu menjadi kusut dan mata tidak cerah
5. Bentuk kotoran	berupa butiran	lembek
6. Hidung	kering	berair

* Hasil pengamatan