

TEKNIK ISOLASI – IDENTIFIKASI *Yersinia pestis* SEBAGAI PENYEBAB
PENYAKIT PES
(HASIL PELATIHAN DI BALAI BESAR VETERINER BOGOR)

Dewi Marbawati*, Hari Ismanto*

Pelatihan teknik isolasi dan identifikasi bakteri penyebab pes dilaksanakan dalam rangka meningkatkan kemampuan laboratorium bakteriologi yang ada di Loka litbang P2B2 Banjarnegara agar memiliki kemampuan melakukan pemeriksaan Pes. Pelatihan dilaksanakan selama 5 hari dari tanggal 29 Juni sampai 3 Juli 2009. Pelatihan dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor dengan dipandu oleh Ibu drh. Tati Ariyanti, MP dibantu oleh dua orang stafnya. Beberapa materi yang diberikan dalam pelatihan ini diantaranya teori umum penyakit pes, pembuatan berbagai media untuk menumbuhkan *Yersinia* sp, uji – uji biokemik dan lain sebagainya.

Pes merupakan penyakit zoonosa terutama pada tikus atau rodent lain dan dapat ditularkan pada manusia serta merupakan penyakit bersifat akut yang disebabkan oleh kuman / bakteri. Selain itu pes juga dikenal dengan nama *Pasteurellosis* atau *Yersiniosis/Plague*. Pes masuk pertama kali di Indonesia pada tahun 1910 melalui Tanjung Perak di Jawa Timur dan selanjutnya menyebar ke beberapa tempat lain di Indonesia. Angka kematian korban yang diakibatkan karena penyakit pes dari tahun 1910 sampai dengan tahun 1960 tercatat 245.375 orang dengan angka kematian tertinggi yaitu 23.275 orang yang terjadi pada tahun 1934.

Pengendalian pes awalnya dilakukan untuk memutuskan kontak antara manusia dengan tikus dengan cara perbaikan perumahan hingga tidak ada lagi tempat tikus bersarang. Selain itu pemberian vaksin juga dilakukan. Awalnya diberikan vaksinasi Haffkine tapi hasilnya tidak memuaskan. Kemudian digunakan vaksin Otten (mulai tahun 1934), ternyata vaksin dapat menurunkan 20 % angka kematian. Mulai tahun 1952 pemberantasan pes dilakukan menggunakan racun serangga berupa “DDT Spraying” dan membawa hasil yang memuaskan.

Vektor dari pes adalah pinjal. Di Indonesia saat ini ada 4 jenis pinjal yaitu : *Xenopsylla cheopsis*, *Culex irritans*, *Neopsylla sondaica* dan *Stivalius cognatus*. Reservoir utama dari penyakit pes adalah hewan – hewan rodent (tikus, marmut, hamster, tupai, dll). Reservoir yang lain adalah kucing, anjing, kelinci, rusa, kambing dll. Di Amerika juga ditemukan pada bajing.

Pes disebabkan oleh Bakteri *Yersinia pestis* (*Pasteurella pestis*). Bakteri berbentuk batang, ukuran 1,5-2 x 0,5-0,7 mikron, bersifat bipolar, non motil/tidak bergerak, non sporing/tidak berspora. Bersifat anaerob fakultatif, gram negatif. *Y. pestis* dapat tumbuh pada perbenihan agar darah (BLD) atau nutrient agar dengan kisaran suhu 25-37 °C. Pada suhu 28 °C merupakan suhu optimum tetapi kapsul yang terbentuk tidak sempurna.

Pada suhu 37 °C merupakan suhu terbaik bagi pertumbuhan bakteri tersebut. Pertumbuhan bakteri akan lebih cepat apabila berada dalam perbenihan yang mengandung darah atau cairan jaringan dan tumbuh paling cepat pada suhu 30 °C. Dalam biakan agar darah pada suhu 37 °C dalam 24 jam dapat muncul koloni yang sangat kecil, berwarna keabu-abuan dan kental.

Beberapa spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan pes adalah darah, bubo sekelan sebesar buah duku pada ketiak/selangkangan, sputum (apusan tenggorokan), nanah, *liquor carebrospinal* (bila ada gejala meningitis). Pada sampel otopsi spesimen yang bisa digunakan yaitu sumsum tulang, kelenjar limpa dan jaringan paru. Pada organ tikus bisa menggunakan limpa paru atau organ hatinya. Disamping itu pemeriksaan terhadap pinjal sebagai vektor pes juga bisa dilakukan.

Teknik isolasi dan identifikasi *Y. Pestis* mempunyai prinsip – prinsip umum pertumbuhan yaitu terdiri dari tiga tahap yaitu : tahap pengkayaan, seleksi pada media agar dan uji biokimia. Tahap Pengkayaan dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 10-25 gram spesimen kemudian dimasukkan dalam blender atau plastik steril dan ditambah 90-225 ml media pengkayaan (dapat menggunakan *Buffered Peptone Water (BPW)*, *Brain Heart Infusion (BHI)* atau menggunakan *Nutrient Broth*). Setelah itu dibuat suspensi spesimen 10 %. Lakukan homogenisasi selama ± 2 menit dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam.

Tahap seleksi pada media agar diawali dengan mengambil 1 ose (dari media pengkayaan) kemudian diinokulasikan/digoreskan pada media *Blood Agar Darah (BLD)* atau menggunakan nutrient agar. Inkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam. Koloni *Y.pestis* pada media agar darah tampak bulat, cembung, kecil, berwarna keabu – abuan dan kental

Tahap Uji Biokimia merupakan tahapan uji koloni yang diduga *Y.pestis* dengan menggunakan berbagai media, yaitu :

1. Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)
Media TSIA memiliki kandungan laktosa, sukrosa dan glukosa. Koloni yang diduga *Yersinia* dipindahkan dari media agar menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada media TSIA dengan menusukkan jarum ose tersebut sampai pada dasar media.
2. Semisolid medium
Dari media TSIA tanpa mengambil koloni baru gunakan jarum ose yang sama inokulasikan pada semisolid medium dengan cara yang sama. Inkubasikan media TSIA dan semisolid pada suhu

*Staf Loka Litbang P2B2 Banjarnegara

- 37 °C selama 24 jam.
3. Koloni yang spesifik pada media TSIA akan memberikan reaksi sbb :
Tabel 1. Reaksi biokimia *Y.pestis* pada media TSIA Media Agar Miring (*Slant*) Agar dasar (*Buttom*) H₂S Gas TSIA Merah Kuning Negatif Negatif
 4. Amati pergerakan yang terjadi pada media semisolid. Apabila bakteri bersifat motil akan terlihat adanya gambaran seperti kapas atau awan dibekas tusukan jarum ose pada media semisolid atau media semisolid terlihat keruh. Kadang – kadang di permukaan media semisolid juga terlihat adanya pertumbuhan bakteri berwarna putih pekat. Apabila bakteri bersifat non motil, tidak terlihat adanya gambaran tersebut diatas dan media terlihat jernih. *Y. Pestis* bersifat non motil.
 5. Lakukan uji indol pada media semisolid dengan meneteskan pereaksi indol dari Kovac sebanyak ±5 tetes, reaksi positif apabila terjadi ring berwarna pink di atas media semisolid tersebut. Reaksi indol negatif tidak berbentuk ring yang berwarna pink. *Y. Pestis* bersifat indol negatif.
 6. Pindahkan dan inokulasikan koloni tersangka dari media TSIA ke media nutrisi agar untuk uji katalase, oksidase dan pewarnaan Gram. Inkubasikan media nutrisi agar pada suhu 37 °C selama 24 jam.
 7. Pindahkan dan inokulasikan koloni tersangka dari media TSIA dengan cara menggosokkan ose ke bagian miring media Simmon's Citrate dan inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Simmon's Citrate positif ditandai perubahan warna media menjadi biru sedang pada reaksi negatif warna media tetap hijau. *Y. pestis* bersifat S. Citrate negatif.
 8. Pindahkan dan inokulasikan koloni tersangka dari media TSIA dengan cara menggosokkan ose ke bagian miring media urea dan inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Urea positif warna media berubah menjadi merah muda dan apabila negatif tidak terjadi perubahan warna media *Y. Pestis* bersifat urea negatif.
 9. Pindahkan dan inokulasikan media MR-VP dengan sejumlah kecil koloni tersangka dari media TSIA dan inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam.
 10. Kedalam media MRVP yang telah diinkubasikan, ditambahkan 2 – 5 tetes reagen *Methyl Red* (MR). Hasil uji MR positif yang ditandai adanya perubahan warna merah setelah penambahan reagen, MR negatif apabila warna media MRVP tidak berubah menjadi merah setelah penambahan reagen MR. *Y.pestis* bersifat MR positif.
 11. Setelah uji MR selesai, lakukan uji VP dengan cara menambahkan 2 – 3 tetes *alpha naphthol* aduk sempurna kemudian tambahkan 1 – 2 tetes 40 % KOH dan aduk kembali. Reaksi VP positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah tembaga di

Tabel 2. Reaksi Biokimia *Y. Pestis*

No	Test Substrate	Hasil Reaksi		
		Positif	Negatif	<i>Y.Pestis</i>
1	2	3	4	5
1	Motility	Terbentuk gambaran seperti kapas/awan disepanjang tusukan ose atau media terlihat keruh	Media jernih	negatif
2	Simmon,s Citrate	Warna media biru	Warna media hijau	negatif
3	Urea	Warna media pink	Warna media kuning	negatif
4	MR	Warna media merah	Warna media kuning	positif
5	VP	Terbentuk cincin merah tembaga di permukaan media	Warna media tidak berubah	negatif
6	Katalase	Terbentuk gelembung/ gas	Tidak terbentuk gelembung/gas	positif
7	Oksidase	Terbentuk warna biru	Tidak terbentuk warna biru	negatif
8	Mannitol	Warna media kuning	Warna media merah	positif
9	Trehalose	Warna media kuning	Warna media merah	positif
10	Xylose	Warna media kuning	Warna media merah	positif

permukaan media MRVP. Reaksi VP negatif ditandai tidak ada perubahan warna media setelah ditambahkan reagen VP. *Y.pestis* bersifat VP negatif.

12. Uji katalase dilakukan dengan cara mencampur koloni *Y.pestis* (yang tumbuh pada media nutrisi agar) dengan 1 tetes pereaksi H₂O₂ 0,3 % pada kaca preparat, dan dicampur hingga rata. Reaksi katalase positif apabila terbentuk gas atau gelembung kecil pada campuran sel tersebut. Reaksi katalase negatif apabila tidak terbentuk gas atau gelembung kecil pada campuran sel tersebut. *Y. Pestis* bersifat katalase positif.
13. Uji oksidase dilakukan dengan cara menyiapkan reagen tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride yang dicampur dengan 3 ml aquadest steril atau NaCl fisiologis menggunakan jarum ose dan lakukan pencampuran dalam cawan petri. Kemudian letakkan kertas saring ke dalam cawan petri tersebut. Ambil koloni tersangka dari media nutrisi agar kemudian letakkan dalam kertas saring pada cawan petri, reaksi dengan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna biru pada koloni tersebut. Reaksi negatif ditandai tidak terbentuk warna biru pada koloni tersangka. *Y. Pestis* bersifat oksidase negatif.
14. Uji pewarnaan Gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan cat gram dari *Amonium oxalat crystal violet*, *lugol*, *acetone iodine decolorizer*, *carbol fuchsin* hingga pencucian dengan air dan dikeringanginkan.
15. Koloni *Y.pestis* selanjutnya diinokulasikan ke dalam beberapa media gula – gula antara lain *adonitol*, *arabinose*, *dulcitol*, *glycerol*, *inositol*, *lactose*, *maltose*, *manitol*, *rhamnose*, *salisin*,

sucrose, *trehalose*, *xylose* dan inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan fermentasi gula – gula dilakukan 1 – 10 hari setelah inokulasi.

Hal - hal yang perlu diperhatikan dalam isolasi dan identifikasi *Y.pestis* adalah penyiapan media (karena media yang digunakan cukup banyak). Beberapa media mempunyai masa kadaluarsa pendek sehingga perlu diperiksa tanggal kadaluarsanya. Disamping itu pembuatan reagen/pereaksi juga perlu diperhatikan. Beberapa reagen yang digunakan diantaranya reagen *Kovac's/indol*, *Methyl Red (MR)*, *Alpha naphthol*, *Voges Proskauer (VP)* dan pewarnaan gram. Hal yang sangat penting untuk keberhasilan isolasi dan identifikasi ini adalah kesterilan alat dan bahan agar tidak terjadi kontaminasi.

Diharapkan dengan dilaksanakannya pelatihan ini dan didukung dengan SDM dan sarana serta prasarana yang memadai, pada masa yang akan datang Loka litbang P2B2 Banjarnegara mempunyai kemampuan untuk melakukan pemeriksaan *Y.pestis* sehingga dapat mendukung kelancaran penelitian di bidang penyakit yang ditularkan tikus (rodensia) pada umumnya dan penyakit pes pada khususnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Modul Pelatihan Teknik Isolasi-Identifikasi *Yersinia pestis* Sebagai Penyebab Penyakit Pes, disusun oleh : drh. Tati Ariyanti, MP, Balai Besar Penelitian Vetereiner, Bogor. Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jenderal PPM&PL, Tahun 2000