INTERPRETASI MIKROSKOPIK DAN POLA PENYEBARAN *BACILLUS ANTHRACIS* PADA LIMPHA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DI INOKULASI SUSPENSI KOLONI *BACILLUS ANTHRACIS*

Alfinus[1], Amir Z[2], Pitri[2], Mappeasse[2] dan Hardiman[3]

1. Medik Veteriner Balai Besar Veteriner Maros
2. Paramedik Veteriner Balai Besar Veteriner Maros
3. Kepala Balai Besar Veteriner Maros

ABSTRAK

Telah terjadi kematian seekor kuda secara mendadak di Kabupaten Gowa Propinsi Sulawesi Selatan dan oleh pemilik dilakukan pemotongan paksa. Hasil pengujian laboratorium Bakteriologi Balai Besar Veteriner Maros dengan metode isolasi dan pewarnaan Methylene Blue pada sampel dari ternak kuda berupa (swab limpa, limpa, potongan bambu, tanah dan rumput) memberikan hasil **Positif *Bacillus anthracis*** sedangkan pada sampel ternak sapi hanya tanah tempat pemotongan paksa disalah satu lokasi yang memberikan hasil **Positif *Bacillus anthracis*.** Uji Biologis telah dilakukan ke mencit sebanyak 6 ekor secara intraperitonel dan subkutan 3 ekor (kesemuannya mati dalam waktu 24-48 jam pasca inokulasi). Nekropsi dilakukan pada seekor mencit yang mati 24 jam pasca inokluasi secara sub kutan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi dan pewarnaan Polychrome Methylene Blue serta preparat sentuh dengan hasil ***Bacillus anthracis*.**

Gambaran makroskopik pada mencit tersebut mengalami gelatinous pada sub kutan, organ limpha mengalami pembesaran (*splenomegaly*), rapuh serta bewarna kehitaman, organ hati, jantung dan paru-paru tampak tidak mengalami perubahan. Semua sampel dimasukkan dalam Buffer Netral Formalin 10% lalu dilanjutkan pembuatan histopatologi dengan pewarnaan Mayers Hematoksilin Eosin.

Interpretasi mikroskopik pada organ limpha terlihat adanya deplesi sel limfosit, infiltrasi sel radang polimorphonuklear dan monomorphonuklear, hemarogika, *giant cell* serta morphologi bakteri *Bacillus anthracis* yang bersifat diffuse.

Untuk mengetahui pola penyebaran *Bacillus anthracis* dilakukan metode Brown dan Brenn, metode ini untuk mengidentifikadi bakteri gram positif atau negatif secara histologi, untuk bakteri gram positif akan terdeteksi berwarna biru, bakteri gram negatif berwarna merah, inti berwarna merah dan bagian jaringan bewarna kuning. Pada organ limpha mencit (*mus musculus*) terlihat bahwa pola penyebaran *Bacillus anthracis* bersifat diffus (menyebar).

I. PENDAHULUAN

Telah terjadi kematian seekor kuda di Kabupaten Gowa, Propinsi Sulawesi Selatan dan ternak kuda tersebut dilakukan pemotongan paksa. Pemotongan dilakukan pada sebelum tim dari Balai Besar Veteriner Maros tiba.

Berdasarkan anamnesa dan perubahan makroskopik dari ternak kuda di organ limpha yang mengalami *splenomegali*, rapuh dan menghitam dengan darah yang menghitam juga tidak mengalami pengumpalan maka kami mengarahkan bahwa diagnosa sementaranya kemungkinan *Bacillus anthracis* sehingga pengujian laboratorium dititik beratkan pada pengujian identifikasi dan isolasi *Bacillus anthracis*.

Isolasi dan identifikasi *Bacillus anthracis* dilakukan secara bertahap yaitu dengan melakukan isolasi umum, pewarnaan Polychrome Methylene Blue dan uji biologis (inokulasi suspensi koloni yang dicurigai *Bacillus anthracis*) pada mencit. Selama ini pasca nekropsi mencit (*Mus musculus*) yang di inokulasi suspensi koloni yang dicurigai *Bacillus anthracis* tidak langsung di musnahkan dengan incinerator tetapi dilanjutkan dengan pemeriksaan histopatologis terhadap limpha guna mengetahui perubahan secara mikroskopiknya.

Metode pewarnaan Brown dan Brenn dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengetahui pola penyebaran bakteri gram positif atau negatif tersebut secara histopatologi, metode akan memberikan hasil untuk bakteri gram positif akan memberikan warna biru, bakteri gram negatif berwarna merah, inti berwarna merah dan bagian jaringan lainnya bewarna kuning.

II. MATERI DAN METODE

A. MATERI.

Materi yang diperlukan dalam pembuatan preparat histopatologi adalah organ limpha dari hewan mencit, pinset, gunting, Buffer Neuthral Formalin 10%, alumunium foil, jarum incinerator, proses pewarnaan Mayers Hematoksilin Eosin dan pewarnaan Gram Brown dan Brenn.

B. METODE

Metode inokulasi secara invivo pada hewan percobaan (uji biologis) adalah

1. Siapkan hewan percobaan mencit sebanyak 6 ekor untuk 2 metode penyuntikan (sub kutan dan intra peritoneal) dimana setiap perlakuan sebanyak 3 ekor.
2. Suntikan suspensi koloni kuman yang dicurigai dengan dosisi 0,1-0,5 ml untuk berat badan mencit 15-20 gr. Penyuntikan pertama secara subkutan dilakukan pada sub kutan paha sebelah dalam sedangkan penyuntikan kedua secara intra peritoneal (setiap cara penyuntikkan diberi tanda yang berbeda)..
3. Amati mencit tersebut, apabila suspensi koloni tersebut bakteri *Bacillus anthracis* maka hewan percobaan akan mati dalam waktu 16 – 48 jam pasca inokulasi. Bangkai hewan percobaan yang mati karena anthraks terlihat

menggembung dan pada autopsy terlihat adanya infiltrasi bersifat gelatin pada subkutis serta pembengkakan limpa yang sangat nyata.

4. Untuk mencit yang mati maka dilakukan isolasi kuman dari berbagai organ serta pembuatan preparat sentuh.

Nekropsi pada mencit dilakukan dengan hati-hati, dimana sekan harus memakai *Personal Protection Equitment* (PPE) lalu organ limpha disimpan dalam Buffer Neuthral Formalin 10% (BNF 10%) dan dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan Mayers Hematoksilin Eosin (HE) serta pewarnaan bakteri Gram yaitu dengan metode Brown dan Brenn..

III. HASIL PENGUJIAN LABORATORIUM

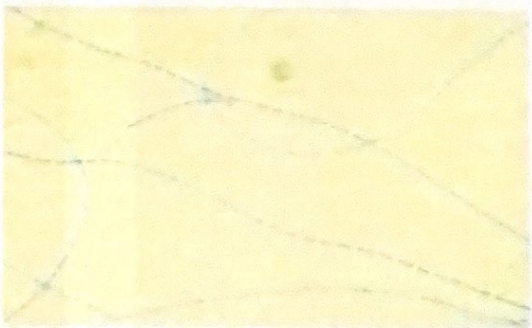
Hasil pengujian dari laboratorium Bakteriologi (sebagai pembuktian bahwa suspensi yang di inokulasi ke mencit adalah suspensi kuman adalah *Bacillus anthracis)* dapat dilhat pada tabel 1 dan gambar dibawah ini;

Tabel 1. Hasil isolasi dan identifikasi *Bacillus anthracis* dari berbagai sampel.

No	Ternak	Sampel	Isolasi Umum	Pewarnaan PMB *	Inokulasi In vivo (Uji Biologis)	
					Isolasi	Pewarnaan
1	Kuda	Limpha	Positif	Positif	Positif	Positif
		Swab Limpa	Positif	Positif	Tidak dilakukan	Tidak dilakukan

* PMB adalah Polychrome Methylene Blue

Gambar 1. koloni *Bacillus anthracis* pada sub culture media agar darah



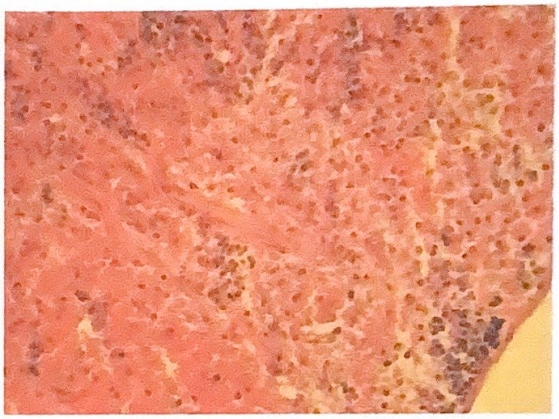
Gambar 2. koloni *Bacillus anthracis* pada pewarnaan Polychrome Methylene blue.

Hasil dari pengujian dari laboratorium patologi baik Makroskopik dan mikroskopiknya serta pola penyebaran Bakteri *Bacillus anthracis* dapat dilihat pada gambar dibawah ini;

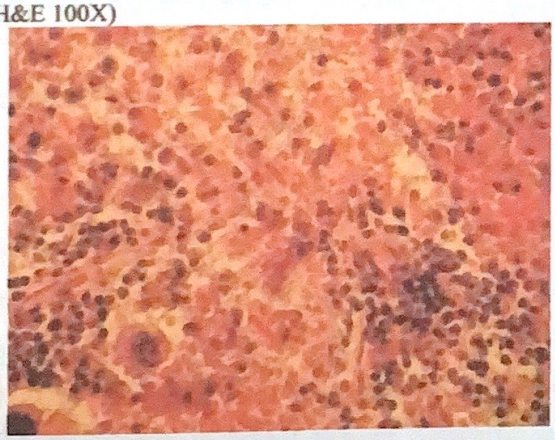
Gambar 3. infiltrasi gelatin pada bagian subkutan

Gambar 4. splenomegaly dan gelatinous di subkutan.

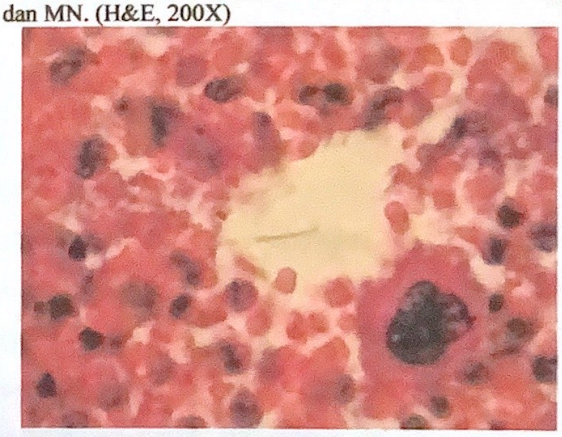
Gambar 5. Limpha mencit yang mengalami deplesi sel-sel limphoid, hemoragica, infitrasi sel radang PMN dan MN (H&E 100X)



Gambar 6. Limpha mencit yang mengalami deplesi sel-sel limphoid, hemoragica, infitrasi sel radang PMN dan MN. (H&E, 200X)

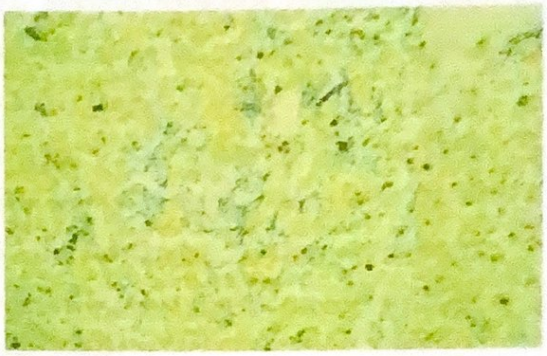


Gambar 7. Limpha mencit yang mengalami deplesi sel-sel limphoid, hemoragica, morfologi sel *Bacillus anthracis*, infitrasi sel radang PMN dan MN serta makrophag (H&E, 400X)

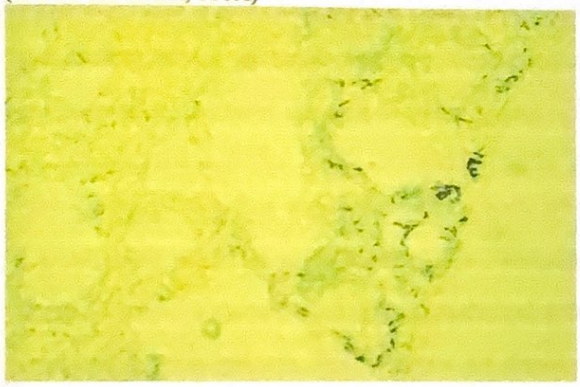


Gambar 8. Limpha mencit yang mengalami deplesi sel-sel limphoid, hemoragica, morfologi sel *Bacillus anthracis*, infitrasi sel radang PMN dan MN serta sel raksasa (H&E, 1000X)

Gambar 9. Bakteri *Bacillus anthracis* (berwarna biru) yang tersebar secara menyeluruh (diffuse) pada limpha mencit (Brown dan Brenn, 100X)



Gambar 10. Bakteri *Bacillus anthracis* (berwarna biru) yang tersebar secara menyeluruh (diffuse) pada limpha mencit (Brown dan Brenn, 200X)



Gambar 11. Bakteri *Bacillus anthracis* (berwarna biru) yang tersebar secara menyeluruh (diffuse) pada limpha mencit (Brown dan Brenn, 400X)

Gambar 12. Bakteri *Bacillus anthracis* (berwarna biru) yang tersebar secara menyeluruh (diffuse) pada limpha mencit (Brown dan Brenn, 1000X)

IV. PEMBAHASAN

Bacillus anthracis merupakan mikroorganisme penyebab penyakit Anthrax. Bakteri ini merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang lurus seperti rantai, berbentuk vegetatif (didalam tubuh hewan) dan berbentuk spora (apabila terkontaminasi dengan udara), spora ini dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi aerobic. Sel bakteri antraks ini juga terdapat eksotoksin kompleks yang terdiri atas *protective Ag* (PA), *lethal factor* (LF), dan *oedema factor* (EF). Peran ketigannya itu terlihat sekali dalam menimbulkan gejala penyakit antraks. Tepatnya, ketiga komponen dari eksotoksin itu berperan bersama-sama. Potective Ag berfungsi untuk mengikat reseptor dan selanjutnya lethal faktor sedangkan oedema faktor akan memasuki sistem sel dari bakteri. Oedema faktor merupakan adenilsiklase yang mampu meningkatkan cAMP sitoplasma sel.

Dalam mempertahankan siklus hidupnya, *Bacillus anthracis* membentuk dua sistem pertahanan, yaitu kapsul dan spora. Dua bentuk inilah, terutama spora yang menyebabkan Bacillus anthracis dapat bertahan hidup hingga puluhan tahun lamanya. sedangkan kapsul merupakan suatu lapisan tipis yang menyelubungi dinding luar dari bakteri. Kapsul ini terdiri atas polipeptida berbobot molekul tinggi yang mengandung asam D-glutamat dan merupakan suatu hapten. Bacillus anthracis dapat membentuk kapsul pada rantai yang berderet. Pada media biasa, kapsul *Bacillus anthracis* tidak terbentuk kecuali pada galur Bacillus anthracis yang ganas.

Bacillus anthracis juga membentuk spora sebagai bentuk *resting cells*. Pembentukan spora akan terjadi apabila nutrisi esensial yang diperlukan tidak memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan, prosesnya disebut sporulasi. Spora berbentuk elips atau oval, letaknya sentral dengan diameter tidak lebih dari diameter bakteri itu sendiri. Spora *Bacillus anthracis* ini tidak terbentuk pada jaringan atau darah binatang yang masih hidup, spora tersebut tumbuh dengan baik di tanah maupun pada eksudat atau jaringan hewan yang mati. Di sinilah keistimewaan bakteri ini, apabila keadaan lingkungan sekitar menjadi baik kembali atau nutrisi esensial telah terpenuhi, spora akan berubah kembali menjadi bentuk bakteri. Spora-spora ini dapat terus bertahan hidup selama puluhan tahun dikarenakan sulit dirusak atau mati oleh pemanasan atau bahan kimia tertentu, sehingga bakteri tersebut bersifat dormant, hidup tapi tak berkembang biak.

Bakteri *Bacillus anthracis* (biasanya dalam bentuk spora) dapat menular kepada hewan lain seperti sapi, kambing, domba (mudah terkena), kuda (kecil kemungkinan), babi dan anjing (agak tahan). (Smith et.all; 1972).

Gejala klinis pada sapi biasanya demam, kadang-kadang aborsi, oedema pada peritoneum dan rongga perut, bila sudah terjadi septisemia dan maka sapi biasanya akan mati secara tiba-tiba. Perubahan patologi anatomi pada darah akan tampak menghitam seperti aspal, seperti jelly, sangat lembut (kejadian ini bisa juga terjadi pada beberapa kasus anoreksia). Perdarahan kecil-kecil (*petechiae*) akan tampak di membran mukosa juga serosa serta jaringan pengikat di subkutan. Infiltrasi cairan gelatin dan akumulasi cairan serous di ruang tubuh. Ciri khas yang spesifik adalah *splenomegaly*. (Jubb,et.all;1970).

Perubahan mikroskopik pada sapi yang terinfeksi *Bacillus anthracis* terlihat adanya hemoragika yang bersifat sistemik, folikel limfoid tampak kosong serta

Perubahan mikroskopik pada sapi yang terinfeksi *Bacillus anthracis* terlihat adanya hemoragika yang bersifat sistemik, folikel limfoid tampak kosong serta terdapatnya morfologi koloni *Bacillus anthracis* (Smith et.all; 1972), sedangkan menurut pola penyebarannya bakteri *Bacillus anthracis* pada limpha terlihat diffuse dengan bakteri *Bacillus anthracis* yang terwarna biru, hal ini disebabkan karena bakteri *Bacillus anthracis* merupakan bersifat gram positif (Luna; 1968).

V. KESIMPULAN

Perubahan patologi secara makroskopik pada mencit (*Mus musculus*) yang diinokulasi adalah terdapatnya infiltrasi gelatinous di sub kutan dan *splenomegaly* sedangkan secara mikroskopik terdapatnya hemarogika, infiltrasi sel radang polimorphonuklear dan monomorphonuklear, makrophag, *giant cells* serta morfologi bakteri *Bacillus anthracis* yang bersifat diffuse.

Pola penyebaran bakteri *Bacillus anthracis* pada organ limpha mencit (*Mus musculus*) dengan metode Brown dan Brenn ternyata bersifat diffuse dengan bakteri Bacillus anthracis yang terwarnai biru.

VI. DAFTAR PUSTAKA

Anonimus (1999). Manual Standard Metoda Diagnosa Laboratorium Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta.

Blood,D.C and Radostits,O.M; 1989; Veterinary Medicine a textbook of the disease of catlle, sheep, pigs, goats and horse; Seventh edition; Bailliere Tindall.

Jubb,K.V.F and Kennedy.P.C; 1970; Pathology of Domestic Animals; Second edition; Academic Press; Nwew York; Volume 1.

Smith.H.A, Jones.T.C and Hunt.R.D; 1972; Veterinary Pathology; Fourth edition; Lea and Febiger; Philadelphia.

Luna L.G; 1968; Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology; Third Edition; The Blakiston Division McGraw-Hill Book Company; New York, Toronto, London, Sydney.