

SUPLAI GAS CO₂ SECARA SEDERHANA UNTUK MEMBIAKKAN *HAEMOPHILUS GALLINARUM*

Oleh

Suprodjo HARDJOUTOMO dan SUTARMA

PENDAHULUAN

Haemophilus gallinarum (HG) adalah kuman penyebab snot menular (Infectious coryza) pada ayam.

Kuman Gram-negatif berbentuk batang bipolar ini pada lingkungan sekitar di luar tubuh hewan penderitanya ternyata tidak mampu bertahan hidup lama. Pada suhu 45°C suspensi HG dalam air hanya mampu bertahan hingga 6 menit dan hanya 2 menit bila suhu dinaikkan menjadi 50°C (Elliot dan Lewis, 1934). Suspensi eksudat infeksius dalam air leding (tap water) mampu bertahan hidup untuk 3 jam lebih, tapi tidak sampai 4 jam; bahkan HG dari media padat yang kemudian disuspensikan dalam air leding akan mati hanya dalam waktu 2 – 4 menit saja (Page, 1962). HG termasuk kuman yang terbilang rewel, artinya tak akan tumbuh bila hanya digunakan media biasa.

Untuk tumbuh HG memerlukan faktor X dan faktor V yang disatukan dalam media penumbuhnya atau dapat juga bila digunakan media khusus seperti agar daging ayam (chicken meat agar), agar darah kuda defibrinasi (defibrinated horse blood agar), agar coklat (chocolate agar) dan lain-lain. Selain itu HG memerlukan atmosfer tertentu untuk dapat tumbuh pada media tersebut di atas tadi. Schalm dan Beach (1936) menyatakan bahwa HG akan tumbuh bagus bila diinkubasikan dalam atmosfer dengan penambahan 10% CO₂.

Menurut para peneliti di atas, HG tidak mau tumbuh pada kondisi aerobik.

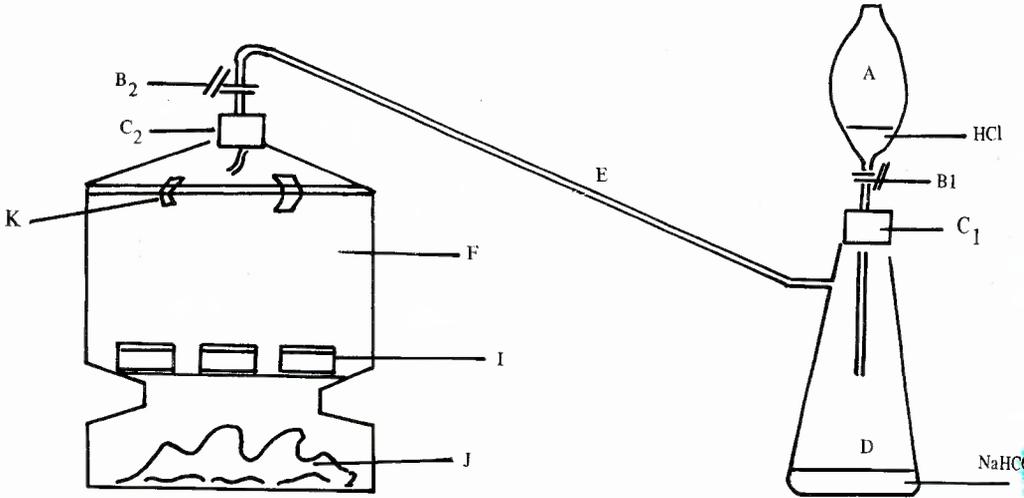
Pada tahun 1976 untuk keperluan suatu penelitian di Bagian Bakteriologi pokok kuman HG kering (lyophilized) yang diperoleh dari NIAH Jepang harus ditumbuhkan dan dibiakkan. Oleh karena pada waktu itu Bagian yang bersangkutan belum memiliki peralatan modern untuk suplai CO₂ bagi menumbuhkan pokok kuman tersebut, maka HG yang diperoleh dengan susah itu terpaksa hanya ditumbuhkan dengan atmosfer plus nyala sepotong lilin dalam suatu bejana tertutup saja. Kemudian ternyata bahwa usaha untuk menumbuhkannya gagal.

Dari kegagalan inilah kemudian dicari upaya, dengan peralatan sederhana yang ada di Bagian Bacteriologi melalui proses kimiawi untuk mampu mensuplai gas CO₂ guna kelangsungan penelitian yang dikehendaki. Adapun mikroorganisme yang dipakai dalam percobaan-percobaan ini adalah HG isolat lokal yang telah dikonfirmasi secara bakteriologik (Hardjoutomo, 1977).

Jerih payah ini ternyata membawa hasil dengan baik sehingga sejak itu penumbuhan dan pembiakan HG sebagai isolat baru eks lapangan maupun isolat lama yang tersimpan di laboratorium berjalan dengan lancar dan sukses.

BAHAN DAN CARA KERJA

Diagram peralatan yang digunakan untuk mensuplai gas CO₂ :



Keterangan :

- A = Corong pisah gelas
- B1, B2 = Keran pengatur gelas
- C1, C2 = Sumbat karet.
- D = Labu erlenmeyer pengaman gelas
- E = Pipa penghubung plastik
- F = Desikator gelas
- I = Media padat dalam cawan petri
- J = Kapas
- K = Plester perekat

1. Media padat cawan dalam petri (I) yang telah dibiaki HG dimasukkan ke dalam desikator gelas (F). Pada dasar desikator ini sebelumnya telah ditaruh gumpalan kapas yang dibasahi dengan air suling secukupnya (J) yang dimasukkan untuk menjaga kelembaban. Tutup desikator dipasangkan dengan terlebih dahulu mengoleskan vaselin seperlunya pada permukaan sambungan tutup maupun badan desikator ini. Hal ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya kebocoran.

2. Kemudian dengan pompa-isap udara dalam desikator dikeluarkan sehingga tekanannya mencapai -600 mm air raksa. Selanjutnya, tutup dan badan desikator dimatikan dengan merekatkan beberapa potong plester (K). Keran pengatur (B2) dalam kedudukan tertutup.
3. Sementara itu ke dalam sebuah labu erlenmeyer pengaman (D) bervolume 1,5 liter dimasukkan natrium hidrogen karbonat atau soda kue berbentuk serbuk (NaHCO_3) sebanyak 2,915 gram. Kemudian disuspensikan dengan menambahkan air suling sebanyak 100 ml. Pada mulut labu erlenmeyer ini dipasang sebuah corong pisah gelas (A) melalui sumbat karet (C1) yang telah dilubangi sedemikian rupa sehingga benar-benar pas dan oleh karena itu dicegah kemungkinan terjadinya kebocoran.
4. Ke dalam corong pisah ini, dalam keadaan keran pengaturnya (b1) tertutup, dimasukkan asam klorida (HCl) 32 % (berat jenis 1,16) sebanyak 3,39 ml yang kemudian diencerkan dengan air suling sampai volume 35 ml (± 1 N).
5. Dengan mempergunakan sepotong pipa penghubung plastik (E) desikator gelas yang telah hampa udara tadi (F) dihubungkan dengan labu erlenmeyer pengaman (D) dengan catatan kedua keran pengatur (B1 dan B2) tetap dalam posisi menutup.
6. Dengan membuka keran pengatur B1, setengah dari volume asam klorida encer dalam corong pisah A dialirkan masuk ke dalam labu erlenmeyer pengaman D, lalu keran B1 ditutup kembali, maka serta merta terjadilah reaksi antara larutan NaHCO_3 dan HCl dengan menghasilkan gas CO_2 . Reaksi terbentuknya gas CO_2 ini jelas sekali terlihat yaitu dengan timbulnya gelembung-gelembung gas dalam labu erlenmeyer D. Sementara itu sumbat karet C1 bersama corong pisah A hendaknya dipegang kuat-kuat supaya tidak terlempar akibat tekanan gas yang ada dalam labu erlenmeyer D tersebut dan gas CO_2 yang terbentuk siap dialirkan ke dalam desikator F.
7. Dengan mengguncang-guncangkan labu erlenmeyer D dan membukakan sedikit demi sedikit keran pengatur B2 serta akibat adanya tekanan negatif dalam desikator F, maka gas CO_2 akan mengalir melalui pipa penghubung E masuk ke dalam desikator.
8. Sisa HCl yang masih ada dalam corong pisah A ditetaskan habis melalui keran pengatur B1 masuk dan bereaksi dengan NaHCO_3 maka timbul gas CO_2 lagi dan mengalir ke dalam desikator F selama tekanan negatif masih ada. Dengan membiarkan keran pengatur B1 tetap terbuka maka udara luar akan memasuki labu pengaman D dan ini berguna untuk membilas CO_2 yang mungkin masih tersisa dalam labu erlenmeyer D.
9. Keran pengatur B2 ditutup, pipa penghubung E dilepaskan. Dengan menempelkan sepotong kertas tipis kecil pada mulut bagian luar pipa gelas yang dipasang pada desikator itu sambil memutar keran pengatur B2 sehingga mem-

buka maka dapat diketahui masih ada/tidaknnya tekanan negatif dalam desikator F.

10. Setelah keran pengatur B2 ditutup kembali maka desikator yang di dalamnya terdapat segumpal kapas basah, media padat yang dibiaki dan udara dengan penambahan 10% CO₂ dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37°C.

PERHITUNGAN TEORITIS SUPLAI GAS CO₂

Desikator yang digunakan dalam percobaan ini bervolume 7,5 liter. Untuk menumbuhkan HG diperlukan tambahan gas CO₂ sebanyak 10% dari volume desikator, ini berarti $\frac{10}{100} \times 7,5 \text{ liter} = 0,75 \text{ liter gas CO}_2$

Diketahui bahwa berat jenis (BJ) CO₂ adalah 0,002, artinya bahwa tiap 1 cm³ gas CO₂ pada suhu 0°C dan tekanan 76 cm Hg (1 atm) mempunyai berat 0,002 gram atau tiap 1 dm³ (1 liter) gas CO₂ pada suhu 0°C dan tekanan 76 cm Hg mempunyai berat 2 gram.

Percobaan ini dilakukan dalam laboratorium di Bogor yang suhu kamarnya rata-rata 27°C.

Hukum Boyle – Gay Lusac menyatakan :

$$B = V \times \frac{P}{76} \times \frac{273}{273 + t} \times \text{B.J.}$$

B = Berat gas (CO₂)

V = Volume

t = Tekanan

t^o = Suhu

B.J. = Berat Jenis

76 = Tekanan udara 1 atm

273 = Koefisien muai gas.

Maka menurut hukum di atas akan diperoleh :

$$B = 1 \times \frac{76}{76} \times \frac{273}{273 + 27} \times 0,002$$

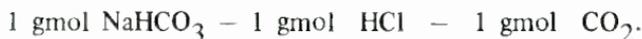
$$B = 1,82$$

sehingga gas CO₂ bervolume 1 liter pada suhu 27°C dan tekanan 76 cm Hg (1 atm) mempunyai berat sebesar 1,82 gram.

Jadi gas CO₂ yang diperlukan sebesar 0,75 liter itu memiliki berat $\frac{0,75}{1} \times 1,82$ gram atau 1,365 gram.

Pada percobaan ini persamaan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :

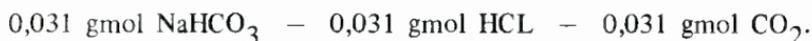




Gas CO_2 yang diperlukan yaitu 1,365 gram itu adalah setara dengan $\frac{1,365}{44}$

gmol CO_2 atau 0,031 gmol CO_2 .

Maka menurut persamaan reaksi di atas :



$$0,031 \text{ gmol NaHCO}_3 = 0,031 \times 84 \text{ gram atau } 2,604 \text{ gram.}$$

$$0,031 \text{ gmol HCl} = 0,031 \times 36,5 \text{ gram atau } 1,132 \text{ gram.}$$

Diketahui hablur NaHCO_3 p.a yang dipakai berkadar 99,5%, berarti bahwa untuk percobaan ini harus disediakan sebanyak $\frac{100}{99,5} \times 2,604$ gram atau 2,617 gram NaHCO_3 .

HCl p.a yang dipakai dalam percobaan ini adalah HCl 32% (v/v) B.J. 1,16 berarti mengandung $\frac{32 \times 1,16 \text{ gram}}{100 \text{ ml}}$ (% berat), sehingga untuk percobaan ini diperlukan HCl sebesar $\frac{100 \times 1,132 \times 1 \text{ ml}}{32 \times 1,16}$ atau 3,05 ml.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa untuk memperoleh gas CO_2 sebanyak 10% dalam desikator bervolume 7,5 liter pada suhu kamar dan tekanan 1 atmosfer bahan kimia :

NaHCO_3 (99,5 %) sebanyak 2,617 gram dan

HCl 32 % (v/v) B.J. 1,16 sebanyak 3,05 ml.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari perhitungan teoritis di muka dapat diketahui bahwa untuk memperoleh suplai gas CO_2 sebanyak 10% dari volume desikator yang dipakai perlu disediakan bahan-bahan kimia NaHCO_3 dan HCl masing-masing sebanyak 2,617 gram dan 3,05 ml.

Namun pada kenyataannya bahan-bahan kimia tersebut ditimbang lebih menjadi NaHCO_3 2,915 gram dan HCl 3,39 ml, sehingga secara perhitungan teoritis gas CO_2 yang terbentuk dan tersalurkan ke dalam desikator menjadi 11,1%. Hal ini memang disengaja dengan maksud untuk menutupi kesalahan-kesalahan yang mungkin terjadi sebagai akibat misalnya kurang sempurnanya reaksi kimiawinya, terjadinya kebocoran pada sumbat karet atau pada sambungan tutup dan badan desikator atau masih adanya gas CO_2 yang terlarut dalam cairan dalam labu erlenmeyer pengaman. Kemungkinan-kemungkinan di atas dihindarkan dengan pemasangan yang pas dan teliti atas sumbat karet penutup maupun pipa plastik penghubung, pengolesan secara merata vaselin pada permukaan sambungan tutup dan badan desikator maupun usaha mengguncang-guncangkan cairan dalam labu erlenmeyer pengaman. Selain itu untuk menghindari terjadinya gas-gas atau hasil ikutan lain yang tak dikehendaki maka bahan kimia yang dipakai adalah yang berkualitas pro analisa (p.a).

Adapun kehilangan udara sebagai akibat dari penghampaan udara dalam desikator pada proses yang mendahuluinya diganti dengan cara mengalirkan udara luar lewat keran-keran pengatur yang dibuka sambil mengguncangkan labu pengaman yang bersangkutan. Pengguncangan labu pengaman dimaksudkan pula untuk membilas dan mengusir bila seandainya masih terdapat sisa gas CO_2 dalam cairan.

Dengan mereaksikan habis bahan-bahan kimia yang telah dihitung sebelumnya itu, maka keperluan gas CO_2 sebanyak 10% dari udara dalam desikator guna menumbuhkan/membiakkan HG dapat dipenuhi.

Dari segi bakteriologiknya hal itu diperkuat yaitu dengan diperolehnya biakan HG yang subur. Lebih subur dari pada pertumbuhan HG yang dibiakkan dalam desikator dengan hanya menggunakan nyala sepotong lilin yang kemudian mati sebagai sumber gas CO_2 .

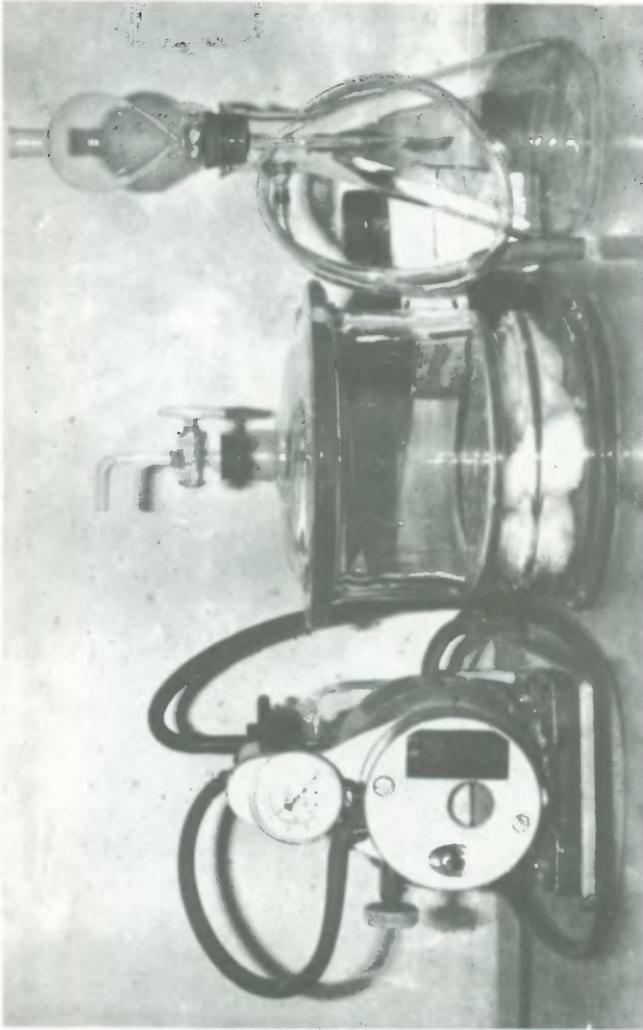
KESIMPULAN

Dengan mereaksikan bahan-bahan kimia $NaHCO_3$ (99,5%) p.a dan HCL 32% (v/v) B.J. 1,16 masing-masing sebanyak 2,915 gram dan 3,39 ml melalui serangkaian corong pisah, erlenmeyer pengaman dan desikator semuanya terbuat dari gelas, telah berhasil disuplai gas CO_2 sebanyak 10% dari isi desikator yang bervolume 7,5 liter guna membiakkan *Haemophilus galinarum* kuman penyebab snot menular pada ayam.

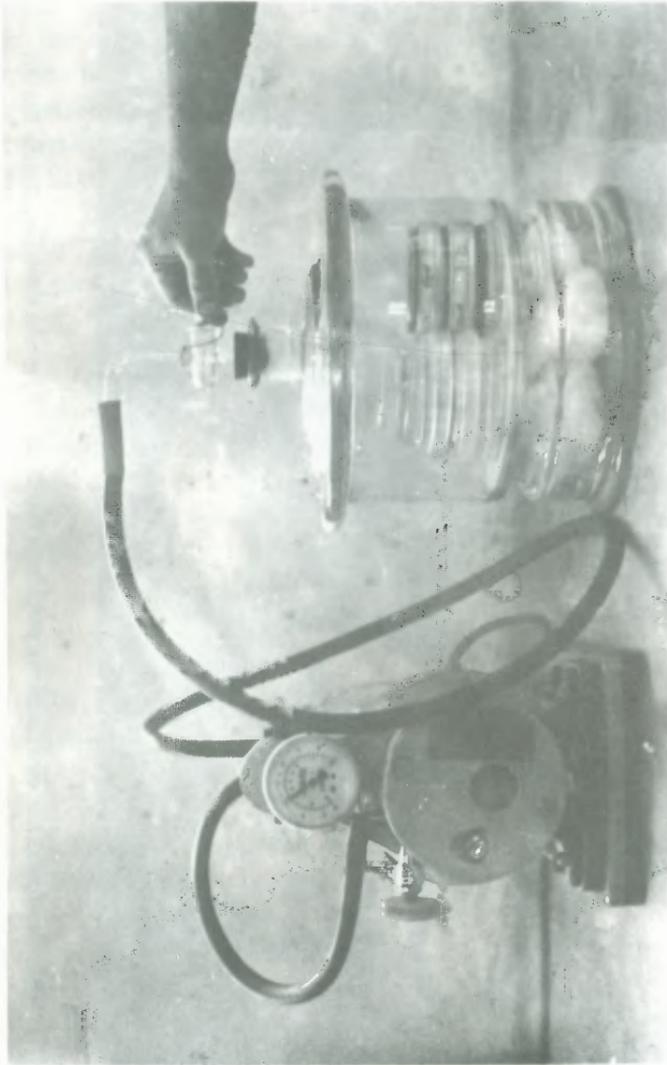
RINGKASAN

Haemophilus gallinarum akan tumbuh subur bila gas CO_2 sebanyak 10% ditambahkan ke dalam udara inkubasinya. Untuk penelitian tertentu yang melibatkan penumbuhan dan pembiakan kuman tersebut pada tahun 1976. Bagian Bakteriologi mengalami kesulitan berhubung tidak dimilikinya peralatan modern untuk suplai gas CO_2 yang diperlukan. Oleh karena itu maka dengan alat-alat gelas dan bahan-bahan kimia yang ada dilakukan percobaan-percobaan untuk menghasilkan gas CO_2 secara proses kimiawi.

Dengan mereaksikan sebanyak 2,915 gram $NaHCO_3$ (99,5%) p.a dengan 3,39 ml HCL 32% (v/v) BJ. 1,16 p.a dalam suatu labu pengaman, maka gas CO_2 yang terbentuk dialirkan ke dalam suatu desikator yang digunakan sebagai bejana pembiak kuman yang bersangkutan. Melalui perhitungan dapat diketahui bahwa dengan mereaksikan habis bahan-bahan kimia tersebut maka suplai 10% gas CO_2 sebagaimana diperlukan dapat dipenuhi. Secara bakteriologik hal ini diperkuat dengan adanya bukti bahwa *H. gallinarum* yang dibiakkan dengan cara tersebut menunjukkan pertumbuhan yang subur dibandingkan dengan *H. gallinarum* yang dibiakkan dengan nyala lilin sebagai suplai CO_2 .



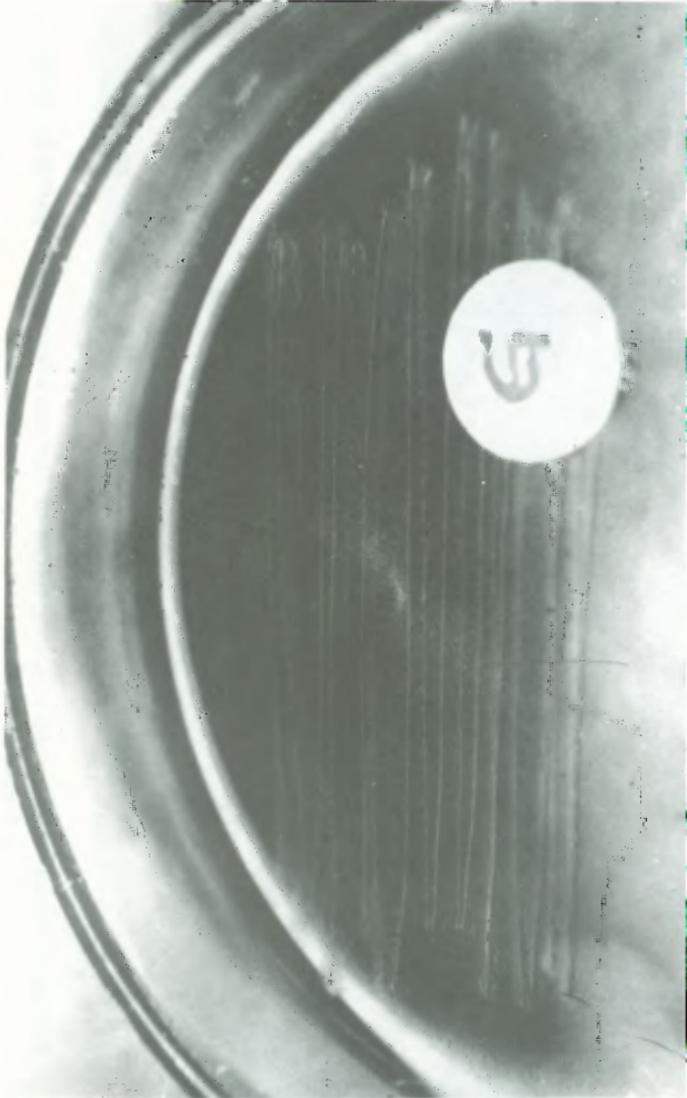
Gambar 1. Peralatan yang dipakai untuk percobaan suplai gas CO₂ secara sederhana Bagian Bakteriologi



Gambar 2. Proses penghampaan udara hingga tekanan – 600 mm Hg dengan pompa isap. Keran pengatur dalam posisi terbuka.



Gambar 3. Proses pengaliran gas CO_2 yang terbentuk dari labu erlenmeyer pengaman ke dalam desikator. Kedua keran pengatur dalam posisi terbuka.



Gambar 4. Koloni *H. gallinarum* pada medium agar daging ayam umur 48 jam yang ditumbuhkan dalam udara inkubasi dengan penambahan 10% CO₂ hasil percobaan, menunjukkan pertumbuhan yang subur.



Gambar 5. Koloni *H. gallinarum* pada medium dan umur yang sama dalam udara inkubasi dengan nyala lilin sebagai sumber CO₂, menunjukkan pertumbuhan yang miskin.

SUMMARY

The growth of Haemophilus gallinarum is greatly enhanced when an atmosphere with 10% carbon dioxide is employed. In 1976 the Bacteriology Section of LPPH faced a serious challenge in growing H. gallinarum because there was no modern equipment to supply carbon dioxide. Thus experiments to produce carbon dioxide were initiated with the available glassware and chemicals.

2.915 gm of NaHCO₃ (99,5%) and 3.39 ml HCl 32% (v/v) SG 1.16 both analytical grade, were mixed in a safety erlenmeyer flask, hence releasing carbon dioxide which was then transferred into the incubating desiccator. By reacting these chemicals in these amounts, the correct percentage of carbon dioxide (i.e. 10%) can be obtained. This fact was confirmed bacteriologically by the finding that H. gallinarum cultivated in the incubating desiccator exhibited an enhanced growth, compared with H. gallinarum cultivated in a candle jar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonymous. 1968. Ilmu Alam, 4-B, Direktorat Jenderal Pendidikan Dasar, Departemen P & K Jakarta.
2. Busser, Herman. --. Penuntun Analisis Djumlah Percetakan DE UNIE - Jakarta.
3. Elliot, C.P. and M.R. Lewis. 1934. A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. J. Am. Vet. Med. Ass, 84 : 878.
4. Hardjoutomo, Suprodjo. 1977. Percobaan pengobatan dengan Sulfamonomethoxine terhadap snot menular (Infectious coryza) pada ayam dalam kondisi tropik. Seminar pertama tentang ilmu dan industri perunggasan 1977 Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan (P4), Bogor, Indonesia.
5. Page, L.A. 1962. Haemophilus infections in chickens, III. Factors intraflock transmission of infectious coryza and its chemical and antibiotic therapeutics. Avian Diseases, 6 : 211.
6. Schalm, C.W. and J.R. Beach. 1936. Studies of Infectious coryza of chickens with special reference to its etiology. Poultry Science, 15 : 473