

LAMPIRAN 1

CARA KERJA PEMBUATAN INOKULUM

A. METODE PROPORSIONAL LJ

Bahan :

1. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* segar dari medium LJ
2. Aquades steril

Alat :

1. Ose
2. Tabung steril dengan diisi *glass beads*
3. Tabung steril tanpa *glass beads*
4. Standar *McFarland 1* (absorbansi 0.348)
5. Bunsen
6. *Laminair*
7. Vorteks
8. Fotometer

Cara Kerja :

1. Persiapan alat (sterilisasi , penulisan identitas pada tabung) dan bahan.
2. Masukkan sejumlah koloni bakteri segar (kurang lebih 1 ose) ke dalam tabung steril (dengan *glass beads*) yang sudah diisi aquades steril.
3. Vorteks selama 30 detik.
4. Pindahkan beberapa ml larutan yang sudah divorteks ke dalam tabung steril dan sesuaikan kekeruhan dengan aquades steril menurut standar *McFarland 1*.
5. Penyesuaian kekeruhan dilakukan dengan mengukur absorbansi menggunakan fotometer.
6. Buat inokulum untuk 27 strain bakteri (Coban et al., 2004).

B. METODE REMA

Bahan :

1. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* segar dari medium LJ

2. *Middlebrook 7H9-S*

Alat :

1. Tabung steril diisi *glass beads*
2. Tabung steril tanpa *glass beads* untuk pembuatan *McFarland 1*
3. Tabung steril untuk pengenceran
4. Ose
5. Pipet dengan tip berbagai ukuran
6. Vorteks
7. Standar *McFarland 1*
8. Bunsen
9. *Laminair*
10. Fotometer

Cara Kerja :

1. Persiapan alat (sterilisasi , penulisan identitas pada tabung) dan bahan.
2. Pembuatan inokulum menurut standar *McFarland 1*
 - Ambil sejumlah koloni dari medium LJ dengan ose kemudian masukkan ke dalam tabung steril (dengan *glass beads*) yang diisi medium 7H9-S.
 - Vorteks selama ± 30 detik.
 - Pindahkan beberapa ml larutan yang sudah divorteks ke dalam tabung steril dan sesuaikan kekeruhan dengan medium 7H9-S menurut standar *McFarland 1*.
 - Penyesuaian kekeruhan dilakukan dengan mengukur absorbansi menggunakan fotometer.
3. Pengenceran inokulum (1 : 20)
 - 1 bagian inokulum yang sudah disesuaikan dengan standar (no.2) ditambahkan 20 bagian medium 7H9-S (Palomino et al., 2002; Montoro et al., 2005)

LAMPIRAN 2

CARA KERJA PEMBUATAN MEDIUM

A. MEDIUM LJ METODE PROPORSIONAL

Bahan :

1. 2,4 gram potasium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)
2. 0,24 gram magnesium sulfat
3. 0,6 gram magnesium sitrat
4. 3,6 gram asparagin
5. 12 ml gliserol
6. 20 ml malakit hijau 2% (2 gram malakit hijau dalam 100 ml aquades steril)
7. Aquades steril
8. 25 – 30 telur bebek berumur kurang 7 hari
9. 70% etanol

Alat :

1. 1 erlenmeyer 1000 ml steril
2. Timbangan analitik
3. *Heater*
4. Pipet *pasteur*
5. Autoklaf
6. Sikat + sabun
7. Gelas ukur
8. *Mixer*
9. Beker *glass*
10. Tabung steril
11. 5 tabung steril
12. *Inspissator*

Cara Kerja :

1. Persiapan alat (sterilisasi, penulisan identitas pada tiap wadah dan tabung) dan bahan (timbang bahan sesuai kebutuhan)

2. Larutkan KH_2PO_4 , magnesium sulfat, magnesium sitrat, dan asparagin dalam 300 ml aquades steril dengan pemanasan pada wadah steril.
3. Larutkan gliserol dan larutan malakit hijau ke dalam larutan garam di atas, kemudian tambahkan aquades steril sampai volume mencapai 600 ml.
4. Autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit kemudian dinginkan pada suhu ruangan.
5. Persiapan telur
 - Bersihkan telur dengan menyikat telur dalam air sabun kemudian rendam selama 30 menit dalam larutan sabun tersebut.
 - Bilas dengan air mengalir
 - Rendam telur dalam etanol 70% selama 15 menit.
 - Cuci dan sikat tangan sebelum memecahkan telur.
 - Pecahkan telur kemudian masukkan ke dalam wadah steril, kemudian kocok dengan *mixer* steril.
6. Campur 1000 ml telur yang sudah dimixer dengan 600 ml larutan garam yang sudah disteril.
7. Distribusikan medium ke dalam tabung-tabung steril dengan volume tiap-tiap tabung 6 – 8 ml kemudian ditutup.
8. Masukkan semua tabung ke dalam inspissator yang sebelumnya sudah dipanaskan sampai 85°C dengan posisi miring selama 50 menit.
9. Koagulasikan kembali medium selama 30 menit setelah disimpan semalam dalam suhu ruangan.
10. Tulis tanggal pembuatan medium.
11. Medium dapat disimpan di dalam lemari es selama 1 bulan selama wadah tertutup rapat untuk mencegah medium kering (WHO, 1998).

B. MEDIUM *MIDDLEBROOK 7H9-S* METODE REMA

Bahan :

1. 2,35 gram *Middlebrook 7H9*
2. Aquades steril
3. 0,5 gram *Tween 80*

4. *Casitone* 0,1%

$$\begin{aligned} 0.1\% &= 0.1 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 0.45 \text{ gram}/450 \text{ ml} \end{aligned}$$

5. 1 vial OADC

Alat :

1. Mikropipet berbagai ukuran
2. Wadah steril bertutup
3. Timbangan analitik
4. Gelas ukur
5. Autoklaf
6. *Heater*

Cara Kerja :

1. Persiapan alat (sterilisasi).
2. Persiapan bahan (timbang bahan sesuai kebutuhan).
3. Larutkan 2.35 gram *Middlebrook 7H9* ; 0.45 gram *casitone* ; dan 0.5 gram *tween 80* dalam 450 ml aquades steril dengan *heating*.
4. Autoklaf 15 lbs , 11°C selama 10 menit.
5. Dinginkan sampai 45°C kemudian larutkan 1 vial OADC.

LAMPIRAN 3

PENGECERAN OBAT

A. METODE PROPORSIONAL LJ

Konsentrasi akhir obat yang akan digunakan adalah 0.2 µg/ml untuk INH dan 40 µg/ml untuk Rif (WHO, 2006).

1. INH (0.2 ug/ml)

- Buat konsentrasi 1 mg/ml = 1000 µg/ml (i)
- 9 ml H₂O + 1 ml larutan (i) = 100 µg/ml (ii)
- 8 ml H₂O + 2 ml larutan (ii) = 20 µg/ml (iii)

Tiap 100 ml medium LJ + 1 ml larutan (iii) = 0,2 µg/ml

2. Rif (40 µg/ml)

- Buat konsentrasi 25 mg/2.5 ml = 10000 µg/ml (i)
- 3 ml metanol + 2 ml larutan (i) = 4000 µg/ml (ii)

Tiap 100 ml medium LJ + 1 ml larutan (ii) = 40 µg/ml

Untuk pembuatan medium LJ yang mengandung obat, maka sebelum medium didistribusikan ke dalam tabung-tabung steril, terlebih dahulu ditambahkan dengan obat yang sudah diencerkan sesuai dengan kebutuhan.

B. METODE REMA

Konsentrasi akhir obat yang akan digunakan adalah 0,25 µg/ml untuk INH dan 0,5 µg/ml untuk Rif (Palomino et al., 2002).

1. INH (0.25 µg/ml)

- Buat konsentrasi 0.1 mg/ml = 100 µg/ml (i)
- Tiap 1 ml medium 7H9-S + 2.5 µl larutan (i) = 0.25 µg/ml

2. Rif (0.5 µg/ml)

- Buat konsentrasi 0.1 mg/ml = 100 µg/ml (i)
- Tiap 1 ml medium 7H9-S + 5 µl larutan (i) = 0.5 µg/ml

LAMPIRAN 4

PEMBUATAN REAGEN RESAZURIN

Bahan :

1. Resazurin bubuk
2. Aquades steril

Alat :

1. Wadah steril bertutup
2. Timbangan analitik
3. Mikropipet berbagai ukuran
4. *Filter*

Konsentrasi Resazurin yang dipakai = 0.01%
= 0.01 gram/100ml

Cara kerja :

1. Persiapan alat (sterilisasi).
2. Persiapan bahan (timbang 0.01 gram resazurin bubuk).
3. Larutkan 0.01 gram resazurin dalam 100 ml aquades steril dalam wadah steril bertutup.
4. Sterilisasi reagen dengan *filter*.
5. Reagen dapat disimpan selama 1 minggu pada suhu 4°C.

LAMPIRAN 5

HASIL PERCOBAAN METODE PROPORSIONAL LJ

Hasil Percobaan Hari ke-28

Strain	Kontrol	INH	Rif	Hasil
236	3+	3+	3+	Resisten
135	3+	3+	3+	Resisten
127	3+	3+	3+	Resisten
167	3+	3+	3+	Resisten
150	3+	3+	3+	Resisten
220	3+	3+	3+	Resisten
169	3+	3+	3+	Resisten
187	3+	3+	3+	Resisten
162	3+	3+	3+	Resisten
138	3+	3+	3+	Resisten
262	3+	3+	3+	Resisten
400	3+	3+	3+	Resisten
113	3+	3+	3+	Resisten
195	3+	3+	3+	Resisten
208	3+	3+	3+	Resisten
136	3+	3+	3+	Resisten
124	3+	3+	3+	Resisten
175	3+	3+	3+	Resisten
131	3+	3+	3+	Resisten
159	3+	3+	3+	Resisten
378	3+	3+	3+	Resisten
265	3+	3+	3+	Resisten
405	-	-	-	Sensitif
379	-	-	-	Sensitif
387	-	-	-	Sensitif
415	-	-	-	Sensitif
H37RV	-	-	-	Sensitif

LAMPIRAN 6**HASIL PERCOBAAN METODE REMA**

Hasil Percobaan Hari ke-8

Strain	Kontrol	INH	Rif	
236	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
135	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
127	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
167	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
150	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
220	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
169	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
187	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
162	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
138	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
262	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
400	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
113	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
195	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
208	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
136	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
124	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
175	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
131	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
159	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
378	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
265	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Resisten
405	Biru	Biru	Biru	Sensitif
379	Biru	Biru	Biru	Sensitif
387	Biru	Biru	Biru	Sensitif
415	Biru	Biru	Biru	Sensitif
H37RV	Biru	Biru	Biru	Sensitif

LAMPIRAN 7
GAMBAR BAHAN DAN ALAT



Autoklaf



Timbangan analitik dan *Heater/Stirer*



RIWAYAT PENULIS

Nama : Veronica Patricia Tanod
Nrp : 0310167
Tempat, Tanggal Lahir : Balikpapan, 26 Januari 1986
Alamat : Jl. Sukakarya IV no. 15a Bandung
Riwayat Pendidikan
Tahun 1997 : Lulus SD Patra Dharma 1 Balikpapan
Tahun 2000 : Lulus SLTP Patra Dharma 2 Balikpapan
Tahun 2003 : Lulus SMU Negeri 1 Balikpapan
Tahun 2003-sekarang : Mahasiswi Fakultas Kedokteran Universitas
Kristen Maranatha