

TESIS

KULTUR BIFASIK AGAR – DARAH SEBAGAI ALTERNATIF METODE CEPAT DAN SENSITIF UNTUK DETEKSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*



TKD

10/07

SUL

K

SULIATI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2007

TESIS

**KULTUR BIFASIK AGAR – DARAH SEBAGAI
ALTERNATIF METODE CEPAT DAN SENSITIF UNTUK
DETEKSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

SULIATI

NIM. 090515534M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2007

**KULTUR BIFASIK AGAR – DARAH SEBAGAI
ALTERNATIF METODE CEPAT DAN SENSITIF UNTUK
DETEKSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh

SULIATI

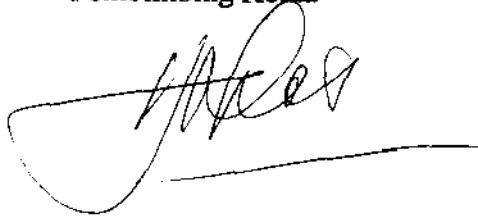
NIM: 090515534 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 16 AGUSTUS 2007

Oleh
Pembimbing Ketua



Prof. Sam Soeharto, dr., MS., Sp.MK.
NIP. 130325826

Pembimbing



Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK.
NIP. 131406054

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar



Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D
NIP. 130541984

Penetapan Panitia Penguji Tesis
Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji
pada Program Pascasarjana universitas Airlangga
Pada tanggal 16 Agustus 2007

Panitia Penguji :

Ketua : Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes.,Sp.MK

Anggota : 1. Prof. Sam Soeharto, dr., MS., Sp.MK.
2. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr.,MS., Sp.MK.
3. Setio Harsono, dr., MS., SpMK.
4. Manik Retno Wahyunitisari, dr, M.Kes
5. Bambang Susilo, dr., M.Kes., Sp.MK

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Profesor. Sam Soeharto, dr., MS., Sp.MK, selaku pembimbing ketua dengan penuh perhatian telah meluangkan waktu untuk memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK, selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian, kesabaran telah meluangkan waktu untuk memberikan dorongan, bimbingan, saran dan pengetahuan kepada saya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih tak terhingga saya ucapkan kepada Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes.,Sp.MK, Setio Harsono, dr., MS., SpMK, Manik Retno Wahyunitisari, dr, Mkes dan Bambang Susilo, dr., M.Kes., Sp.MK. yang telah memberikan usulan – usulan demi perbaikan tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Retno Handajani, dr.,MS.,Ph.D selaku Ketua Program Studi IKD, Dr.H.Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK, selaku Ketua Minat Mikrobiologi yang telah banyak memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Dengan selesainya tesis ini, perkenalkan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga, Prof Dr Fasich, Apt. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof Dr H. M. S. Wijadi, dr, SpTHT, atas kesempatan yang diberikan untuk menjadi mahasiswa Program Magister.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammad Amin, dr. atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Magister.

Ketua TKPPS, Prof Dr Harjanto, JM, dr, AIF. yang telah banyak memberikan kesempatan kepada saya sampai terselesainya pendidikan.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada seluruh dosen Ilmu Kedokteran Dasar, khususnya Minat Mikrobiologi yang telah memberi Motivasi, Ilmu dan dorongan dalam menempuh pendidikan Program Magister.

Semoga kebaikan dan bantuan yang telah diberikan kepada saya, mendapatkan imbalan dan rahmat dari Allah SWT. Amiiinnn.

RINGKASAN

Kultur bifasik agar – darah sebagai alternatif metode cepat dan sensitif untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis*

Di Indonesia tuberkulosis paru (TB) juga masih merupakan masalah kesehatan, diperkirakan sekitar 583.000 kasus ditemukan basil tahan asam (BTA) positif setiap tahun.

Penegakkan diagnosa TB pada program Nasional penanggulangan TB berdasar pemeriksaan mikroskopis BTA dari sputum sewaktu – pagi – sewaktu (S-P-S) namun ada kendala sensitivitas .

Diagnosis definitif tuberkulosis paru berdasar pemeriksaan kultur untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* merupakan uji yang paling akurat sampai saat ini, namun kultur pada media padat juga masih terdapat kendala yaitu memerlukan waktu cukup lama.

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan perbedaan sensitivitas deteksi dan kecepatan pertumbuhan *Mykobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar –darah dengan media Lowenstein-Jensen.

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan 68 sampel sputum yang berasal dari penderita dengan suspek tuberkulosis paru di poli paru RSUD Dr Soetomo. Sputum dilakukan dekontaminasi dan konsentrasi menggunakan metode modifikasi alkali Petroff (WHO). Sedimen dikultur pada media bifasik agar - darah dan Lowenstein-Jensen.

Perbedaan tingkat sensitivitas detekksi *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur pada media bifasik agar – darah dengan Lowenstein-Jensen, diamati pada hari ketiga sampai hari ketujuh, dan analisis hasil penelitian secara deskriptif.

Perbedaan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur pada media bifasik agar darah dengan Lowenstein-Jensen dilakukan analisis menggunakan uji statistik Mann-Whitney, pada pengamatan hari ke tujuh.

Hasil penelitian menunjukan bahwa : Sensitivitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur menggunakan media bifasik agar – darah pada pengamatan hari ketiga sudah dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* dari seluruh sampel 36 sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) menunjukan pertumbuhan 100%; dan dari 32 sampel BTA negatif masih dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada 25 sampel (78,14 %). Pada kultur menggunakan media Lowenstein – Jensen tidak dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* dari semua sampel 32 sputum BTA negatif (-) sampai pengamatan hari ketujuh; dan dari 36 sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) juga belum dapat dideteksi.pada pengamatan hari ketujuh.

Kecepatan pertumbuhan terdapat deteksi *Mycobacterium tuberculosis* perbedaan yang bermakna antara kultur bifasik agar – darah dengan Lowenstein – Jensen.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini ternyata sensitivitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur menggunakan media bifasik agar – darah lebih tinggi dari pada menggunakan media Lowenstein – Jensen, dan culture pada

media bifasik agar – darah lebih cepat memberikan hasil deteksi daripada media Lowenstein – Jensen.

Saran dari penelitian ini diharapkan media bifasik agar darah dapat digunakan secara rutin untuk menegakkan diagnosis tuberculosis, dan apabila ada penelitian lebih lanjut untuk melengkapi uji validitas

SUMMARY

Biphasic agar – blood culture as rapid and sensitive alternative Method for *Mycobacterium tuberculosis* detection

In Indonesia, pulmonary tuberculosis (TB) still as the health problem, estimated 583.000 casus with positive acid fast bacilli (AFB) every year.

Pulmonary tuberculosis diagnosis in National / TB program recommended AFB / microscopic examination of spot-morning-spot sputum, but still have the problem on sensitivity.

Definitive diagnosis of TB based on culture examination to detect *Mycobacterium tuberculosis* is the most accurate method, otherwise culture method at solid media have the problem, especially on prolonged time.

The objective of this research to exam the sensitivity difference on *Mycobacterium tuberculosis* detection and growth rate between biphasic agar – blood culture media and Lowenstein – Jensen

This research examine 68 sputum sample from TB suspects in pulmonologic clinic, Dr Soetomo Hospital the sputum decontaminate and concentration by alkali Petroff modification method (WHO). Sedimen inoculate in biphasic agar –blood and Lowenstein – Jensen medium.

The sensitivity to *Mycobacterium tuberculosis* detection were examined at 7 days observation, and the significance difference were examined statistically using Mann – Whitney.

The growth rate were examined at 3 to 7 days observation. Biphasic agar – blood culture results as follow *Mycobacterium tuberculosis* detection from 32 AFB negative sputum culture were positive 25 (78,14%) at 7 days observation; All of 36 sputum AFB positive 1+, 2+, 3+ were detected *Mycobacterium tuberculosis* (100%) at 3 days observation.

The otherwise in Lowenstein – Jensen culture, all of 32 (100%) sputum AFB negative were negative colony growth until 7 days observation and all of 36 sputum AFB positive were negative colony growth until 7 days observation.

The difference of growth rate between culture method using biphasic agar-blood medium with Lowenstein-Jensen was significant.

The ingestion from this research is as biphasic agar – blood usable to determine tuberculosis diagnosis and a rutine procedure, if the research continue to improve study on complete validity examination.

ABSTRACT

Biphasic agar – blood culture as rapid and sensitive alternative Method for *Mycobacterium tuberculosis* detection

Sixteen eight sputum sample from pulmonary tuberculosis suspects with negative and positive acid fast bacilli (AFB) were examined to compare the sensitivity and rapidity of *Mycobacterium tuberculosis* detection between Biphasic agar – blood culture medium and Lowenstein – Jensen.

The sensitivity to *Mycobacterium tuberculosis* detection were examined at 7 days observation, and the significance difference were examined statistically using Mann – Whitney .

The growth rate were examined at 3 to 7 days observation. Biphasic agar – blood culture results as follow *Mycobacterium tuberculosis* detection from 32 AFB negative sputum culture were positive 25 (78,14%) at 7 days observation; All of 36 sputum AFB positive (1+, 2+, 3+) were detected *Mycobacterium tuberculosis* (100%) at 3 days observation.

The otherwise in Lowenstein – Jensen culture, all of 32 (100%) sputum AFB negative were negative colony growth until 7 days observation observation and all of 36 sputum AFB positive were negative colony growth until 7 days observation.

The difference of growth rate between culture method using biphasic agar-blood medium with Lowenstein-Jensen was significant.

The conclusion of this research results were the Biphasic agar – blood culture have highly sensitivity and rapid method for *Mycobacterium tuberculosis* detection.

Keywords : Biphasic agar – blood, *Mycobacterium tuberculosis* detection.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	vii
Summary.....	ix
Abstrak.....	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	4
1.3 Rumusan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tuberkulosis	7
2.1.1 Transmisi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
2.1.2 Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2 Patogenesis Tuberkulosis	8
2.3 Manifestasi Klinik Tuberkulosis	9
2.3.1 Penyakit Tuberkulosis Primer	9
2.3.2 Penyakit Tuberkulosis Pasca Primer	10
2.4 Epidemiologi Tuberkulosis	10
2.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.6 Karakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.7 Faktor Virulensi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
2.8 Pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
2.9 Teknik Kultur pada Media	16
2.9.1 Prinsip media Lowenstein-Jensen (L-J)	16
2.9.2 Prinsip media Middlebrook 7 H10 dan Middlebrook selektif 7H11 [S7H11]	17
2.9.3 Prinsip media BACTEC (Middlebrook 7H12) dan BACTEC 460 TB	18
2.9.4 Media padat Ogawa sebagai Media Kultur Tuberkulosis	19
2.10 Ketahanan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	21
BAB 4 METODE PENELITIAN	24
4.1 Rancangan Penelitian	24

4.2 Variabel Penelitian	24
4.3 Devinisi Operasional	24
4.4 Sampel Penelitian	25
4.5 Pengumpulan Data	26
4.6 Analisis Data Penelitian	26
4.7 Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.8 Bahan, Reagensia, Peralatan dan Media	27
4.9 Prosedur Pemeriksaan Kultur	28
4.9.1 Preparasi Media Lowenstein-Jensen (L- J)	28
4.9.2 Preparasi Media Bifasik Agar – Darah	28
4.9.3 Dekontaminasi dan Konsentrasi Sputum dengan NaOH (metode modifikasi Petroff , WHO).	29
4.9.4 Kultur Sputum pada Media L-J	30
4.9.5 Kultur Sputum pada Media Bifasik Agar – Darah	31
4.9.6 Menghitung Jumlah Koloni Berdasarkan Kriteria WHO	31
4.9.7 Kontrol Strain	32
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	34
5.1 Data Penelitian	34
5.1.1 Hasil penelitian pemeriksaan kultur sputum	34
5.1.2 Hasil pemeriksaan kultur dan sampel sputum	35
5.2 Analisa Hasil Penelitian	38
BAB 6 PEMBAHASAN	42
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	49
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Distribusi kultur dari 68 sampel sputum BTA negatif dan BTA positif.....	34
Tabel.5.2. Kecepatan pertumbuhan antara media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein–Jensen, dari sampel sputum BTA negatif (-) sampai BTA positif (+)	38
Tabel.5.3. Hasil Uji Mann – Whitney untuk melihat perbedaan pertumbuhan kultur bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein–Jensen pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh.....	40
Tabel.5.4. Hasil sensitivitas pertumbuhan bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> antara media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein–Jensen pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh.....	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada media kultur bifasik agar – darah dari spesimen sputum BTA positif (-). Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh.....	36
Gambar 5.2 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada media kultur bifasik agar – darah dari spesimen sputum BTA positif (1+). Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh.....	36
Gambar 5.3 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada media kultur bifasik agar – darah dari spesimen sputum BTA positif (2+ dan 3+). Pada inkubasi hari ke tujuh.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Tabel Tabulasi Hasil pertumbuhan pemeriksaan pada media kultur dalam Pengamatan koloni <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada inkubasi hari ke tujuh dari sampel sputum BTA negatif (-) dan BTA positif (+).....	54

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit tuberkulosis (TB) masih merupakan masalah kesehatan masyarakat. Pada tahun 1995, menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) ternyata menunjukkan bahwa prevalensi TB menduduki peringkat ke tiga setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernafasan pada semua kelompok usia, dan nomer satu dari semua golongan penyakit infeksi. Pada tahun 1999, WHO memperkirakan setiap tahun terjadi 583.000 kasus TB baru dengan kematian karena TB sekitar 140.000; secara kasar diperkirakan setiap 100.000 penduduk Indonesia terdapat 130 penderita baru TB paru dengan basil tahan asam (BTA) positif. Penyakit TB menyerang sebagian besar kelompok usia kerja produktif, kelompok ekonomi lemah, dan berpendidikan rendah (Depkes RI, 2002).

Hampir tidak ada satupun Negara di dunia yang bebas dari penyakit TB. Pada tahun 2002, di Indonesia, menurut data WHO, jumlah penderita penyakit TB menempati urutan ke tiga setelah India dan Cina. Pada tahun 2000, dalam urutan insiden kasus baru TB dari ke tiga negara ini yaitu di India dilaporkan 1.856.000 kasus, di Cina dilaporkan 1.365.000 kasus, di Indonesia sejumlah 595.000 kasus. Masalah TB, selain peningkatan prevalensi atau insiden, diperberat dengan masalah peningkatan prevalensi infeksi HIV atau AIDS. Adanya peningkatan

insiden TB koinfeksi HIV dapat meningkatkan kesulitan pengobatan. Demikian pula dengan masalah dalam peningkatan resistensi obat antituberkulosis (OAT). Peningkatan prevalensi TB, TB koinfeksi HIV, maupun TB resisten OAT, berakibat peningkatan resiko penularan, demikian juga menjadi kendala pengendalian TB (Kim SJ, 1998).

Menurut strategi *directly observed tretment*, *shocourse chemotherapy* (DOTS), program penanggulangan TB dilaksanakan dalam salah satu komponen utama adalah menegakkan diagnosa TB berdasarkan ditemukan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum suspek TB (Depkes RI, 2002).

Diagnosis TB terutama ditegakkan berdasarkan pemeriksaan sputum secara mikroskopis langsung dengan metode sputum tiga kali, sewaktu, pagi, sewaktu (SPS). Pada kasus kronik atau gagal pengobatan dilakukan metode diagnosis konfirmatif TB melalui pemeriksaan kultur atau biakan sputum. Metode kultur standar untuk diagnosis TB, selain berguna untuk diagnosis konfirmatif atau definitif juga berperan penting pada uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti tuberkulosis. Berdasarkan pemeriksaan kultur ditemukannya kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang hidup, juga memiliki keuntungan pada monitoring pengobatan maupun deteksi kasus resistensi – MDR (Multi-Drug-Resistant), pada prinsip kultur untuk memperbanyak atau menumbuhkan bakteri, untuk mengatasi kesulitan diagnosa pada kasus TB koinfeksi HIV yang sering dilaporkan dengan BTA negatif. Sampai saat ini, masih banyak digunakan pemeriksaan kultur dengan standar

konvensional yaitu media Lowenstein – Jensen. Pada pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang lambat, memerlukan waktu yang lama lebih dari tiga minggu (Sandjaya, 1995).

Sputum dari penderita suspek TB paru dengan batuk yang lama, lebih dari tiga minggu berasal dari lesi jaringan parenkim paru yang pecah ke saluran *bronkus*, oleh karena itu diagnosa TB paru ditegakkan dengan dasar ditemukannya basil *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum.

Media perbenihan bertujuan memperbanyak bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam spesimen sputum, sehingga dapat meningkatkan deteksi sensitifitas. Pada saat ini, telah berkembang metode kultur yang akurat dan sensitifitas, pada kultur media cair maupun media padat, seperti BACTEC system, Mycobacteria Growth Indikator Tube (MGIT), maupun *microcolony – culture*, namun masih ada kendala pada biaya yang mahal. Dengan demikian masih terus berkembang penelitian – penelitian bidang kultur *Mycobacterium tuberculosis* untuk menemukan metode yang akurat dan sederhana dengan biaya yang murah (Forbes BA, *et al.*, 2005).

Modifikasi media nutrien agar yang mengandung serum ditambahkan darah manusia yang diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI), terdiri dari bagian media padat dan media cair. Media cair berupa darah diharapkan meningkatkan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, karena kaya zat besi dan albumin, serta penambahan penisilin 100 units/ml, untuk tujuan menghambat mikroba kontaminan *non Mycobacterium*. Media cair berupa darah diharapkan mirip dengan kondisi

invivo pada jaringan parenkim paru yang juga kaya zat besi dan albumin dan nutrisi lainnya. Media padat agar miring diharapkan untuk tujuan mengendapkan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yang ada dalam media cair atau darah, pada permukaan media tumbuh menjadi koloni karakteristik sehingga mudah dideteksi dan dapat dilakukan identifikasi. Dengan demikian diharapkan media bifasik agar darah dapat mempercepat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara optimal sehingga mudah dilakukan identifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kultur bifasik agar – darah untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* memberikan hasil kultur yang lebih cepat dan sensitif dibandingkan dengan hasil kultur pada media Lowenstein – Jensen kemudian dari penelitian ini diharapkan kultur bifasik agar – darah sebagai alternatif metode cepat dan sensitif untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* serta biayanya relatif murah. Penegakan diagnosis TB yang akurat sangat membantu penentuan pengobatan segera yang tepat, sehingga mempercepat kesembuhan penderita; dengan demikian bermakna memutus rantai penularan.

1.2. Permasalahan

Metode penanaman dalam media kultur standar konvensional membutuhkan waktu yang lama, lebih dari tiga minggu, dengan demikian diperlukan suatu alternatif media kultur dengan metode cepat dan akurat untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3. Rumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan sensitifitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen ?
2. Apakah ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum suspek TB paru pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen ?

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan umum :

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa kultur bifasik agar – darah dapat digunakan sebagai alternatif metode cepat dan sensitif untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis*.

Tujuan khusus :

1. Membuktikan ada perbedaan sensitifitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum suspek TB paru pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen.
2. Membuktikan ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum suspek TB paru pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat di bidang keilmuan

Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam pengembangan pengetahuan nutrisi atau kebutuhan pertumbuhan pada media kultur untuk *Mycobacterium tuberculosis*.

1.5.2 Manfaat praktis di laboratorium pelayanan kesehatan

Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat di laboratorium pelayanan kesehatan sebagai metode kultur yang akurat, sederhana dan cepat pada diagnosis tuberkulosis.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

Tuberkulosis paru adalah infeksi yang sering ditemukan disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penularan dapat terjadi melalui inhalasi dari manusia ke manusia secara kontak langsung, terdapat didalam droplet yang mengandung partikel *Mycobacterium tuberculosis* dari sekeliling penderita tuberkulosis paru (Forbes BA, *et al.*, 2005).

Berdasarkan bakteri tahan asam yang sangat kuat dan dapat hidup dalam kondisi lingkungan yang kurang baik, manusia adalah satu-satunya tempat hidup bagi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Tolan RW, 2006). Penularan melalui inhalasi dengan adanya droplet yang mengandung organisme (berukuran 1 – 5 μm). Pada penderita tuberkulosis paru penularan melalui batuk, bersin, berbicara atau bernyanyi atau dalam proses penanganan spesimen klinis di laboratorium (Forbes BA, *et al.*, 2005).

2.1.1 Transmisi *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis dapat ditularkan dari manusia ke manusia melalui droplet, dengan unsur partikel 1 – 5 μm yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penderita tuberkulosis paru dalam penularan dapat dengan cara melalui batuk, bersin, berbicara, atau bernyanyi. Juga dapat mengkontaminasi di udara,

induksi sputum, aerosolisasi selama dalam bronchoscopy, dan melalui manipulasi lesi atau proses dalam jaringan, terjadi sekresi dalam rumah sakit atau laboratorium. Secara normal droplet yang berisi dua atau tiga organisme *Mycobacterium tuberculosis* ini sangat kecil bila ada di dalam rumah, tetapi bila ada di udara memerlukan waktu yang lama. Droplet seperti ini cukup kecil untuk menjangkau alveoli di dalam paru – paru, dan juga untuk mengadakan replikasi (Blumberg HM, 2003).

2.1.2 Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis penyebab penyakit tuberkulosis, salah satu menyebabkan infeksi pada manusia lanjut usia dan bakteri ini dapat menginfeksi di seluruh organ tubuh (Monack, *et al.*, 2004). Penyakit tuberkulosis yang di transmisikan oleh ekspulsi droplet dari manusia yang terinfeksi ke manusia yang tidak terinfeksi (Clark-Curtiss, 2003).

2.2 Patogenesis tuberkulosis

Respons manusia yang telah terpapar oleh basil tuberkel yang virulen tergantung pada dua respons imunologi utama yaitu memperoleh imunitas seluler dan hypersensitifitas tipe lambat (Joklik, *et al.*, 1988). Dari droplet, dengan kontak langsung melalui inhalasi dan dibawa oleh airstream dalam paru-paru. Basil ini dicerna oleh makrofag dalam rongga implantasi, dan setelah periode lanjut beberapa hari, basil diperbanyak didalam satu atau lebih dari sel, dengan cepat akan

membunuh makrofag dan basil lepas kemudian akan dicerna oleh makrofag lain, proses ini bersifat kontinu. Lesi pertama membesar, beberapa organisme diangkut ke getah bening yang akan mengalir ke area yang berisi lesi pertama. Getah bening membesar dan mengalirkan basil *intracellular*, situasi demikian di mana basil akan lepas kemudian bocor, jadi getah bening akan membengkak (Balasubramanian, *et al.*, 1994). Basil dapat langsung menyebabkan penyakit di organ tersebut atau hidup dorman dalam makrofag jaringan dan dapat menyebabkan tuberkulosis aktif bertahun-tahun, kemudian basil dapat berkembang biak *ekstraselular* sehingga dapat meluas di jaringan paru.

2.3 Manifestasi Klinik tuberkulosis

Diperkirakan terdapat 8 sampai 10 juta kasus baru tuberkulosis setiap tahun di dunia di saat ini dan sekitar 3 juta menyebabkan kematian. Infeksi pada umumnya diakibatkan oleh organisme yang keluar dari paru-paru yang luka. Pasien TB mengalami gejala tidak spesifik seperti tidak enak badan, lelah dan demam yang rendah. Perkembangan gejala yang spesifik tergantung pada organ yang sakit dan infeksi yang meluas (Joklik, *et al.*, 1988).

2.3.1 Penyakit tuberkulosis Primer

Infeksi primer dapat terjadi secara inhalasi, maupun kontak secara langsung dengan *Mycobacterium tuberculosis*, droplet yang terhirup dalam ukuran yang sangat kecil, sehingga dapat melewati sistem pertahanan mukosilier bronkus dan terus masuk sampai di alveolus.

Kuman ini akan berkembang biak di paru. Saluran limfe akan membawa bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ke kelenjar limfe di sekitar hilus paru, dan ini disebut sebagai kompleks primer. Dalam waktu antara terjadinya infeksi sampai pembentukan primer sekitar 4 – 6 minggu. Adanya infeksi dapat dibuktikan dengan terjadi perubahan reaksi tuberkulin.

2.3.2 Penyakit tuberkulosis Pasca Primer

Terjadi setelah infeksi primer, karena reaktifasi atau reinfeksi. Reaktifasi terjadi akibat bakteri dorman yang berada pada jaringan selama beberapa bulan atau tahun setelah infeksi primer, mengalami multiplikasi, hal ini dapat terjadi akibat daya tahan tubuh yang lemah. Reinfeksi terjadi adanya infeksi ulang pada penderita yang sebelumnya pernah mengalami infeksi primer. Tuberkulosis post primer umumnya menyerang paru, karakteristiknya dengan adanya kerusakan paru yang luas dengan terjadinya kavitas atau efusi fleura, hapusan sputum dengan BTA positif.

2.4 Epidemiologi tuberkulosis

Mycobacterium tuberculosis adalah suatu masalah global, walaupun metode efektif untuk pengendalian itu tersedia dan akan diterapkan dengan sukses dalam beberapa tahap di daerah yang prevalensi penderita masih tinggi belum dapat terkendalikan. Pada dataran tinggi pengurangan tentang insiden adalah jelas, karena bakteri *Mycobacterium*

tuberculosis dapat menyebabkan kematian karena penyakit yang infeksius ini harus cepat di laporkan (Joklik, *et al.*, 1988).

Sebelum pandemik human immunodeficiency virus (HIV), dan imunokompeten bagi orang dewasa, telah diamati berdasarkan *extrapulmonary tuberculosis* (EPTB) sekitar 15 sampai 20 persen dari semua kasus tingkat mortalitas dari tuberkulosis, di Amerika Serikat ada 0,6 meninggal dari 100 individu, kira-kira 1.700 meninggal per tahun. Penyakit tuberkulosis yang paling umum menyebabkan kematian dari penyakit yang cepat menyebar, setelah HIV/AIDS. Tahun 2000 diperkirakan ada 89 juta kasus tuberkulosis baru (Frieden TR., 2003). Dalam penurunan insiden penyakit tuberkulosis ada 44% di Amerika Serikat baru tercatat dari tahun 1993-2003, paling rendah jumlah kasus dilaporkan pada tahun 2003 (14,874) (Tolan RW, 2006). Tingkat yang paling tinggi perkapita di Afrika (29% dari semua kasus TB), separuh dari semua kasus baru ada 6 negara ASEAN yaitu Bangladesh, China, India, Indonesia, Pakistan dan Philipines (Forbes BA, *et al.*, 2005).

Multi – Drug – Resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* yang bersifat resistant lebih dari satu anti – obat tuberkulosis terutama dua obat utama – isoniazid dan rifampicin. Dari 35 negara-negara pada tahun 1994 – 1997, resistensi obat TB, dalam tabulasi survei ada 63 pengawasan resistansi anti – obat tuberkulosis yang diselenggarakan oleh WHO dan International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). Prevalensi MDR adalah 13% (range dari 0 – 54%) dalam pasien dengan perawatan satu bulan atau lebih. Seluruh prevalensi adalah

2.2% (range dari 0 – 22.1%), dari Negara Asia, Dominican Republik dan Argentina. Kesimpulan bahwa resistansi anti – obat tuberkulosis telah ditemukan dalam 35 negara dan daerah yang disurvei. Penanggulangan program TB disusun kembali, secara global yang ditunjang oleh pengguna strategi DOTS, untuk semua kasus hapusan dengan BTA positif. tuberkulosis baru dalam fase intensif ada empat obat (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, dan ethambutol atau streptomisin), sedang semua kasus re-treatment menerima lima anti – obat tuberkulosis. Pada tahun 1999, cara hidup yang distandarlisasi dengan efektifitas terbukti bermanfaat, WHO menetapkan kelompok kerja pada DOTS – Plus untuk MDR-TB. Pada bulan Mei 2006 kelompok kerja telah kembali untuk membahas penghentian TB dengan MDR – TB. Telah diselenggarakan lima kali pertemuan kelompok kerja pada tahun 1999, di Negara Peru (2001), Estonia (2002), Perancis (2003 dan 2005) dan AS (2006). Lebih dari 500 orang tengah menghadiri pertemuan ini dan mendukung pekerjaan kelompok kerja untuk mewakili negara-negara, para agen multilateral dan dari dua belah pihak, organisasi internasional, organisasi bukan pemerintahan, wakil masyarakat, universitas dan industri yang bersangkutan (farmasi). November 2006, 51 proyek dalam 40 negara telah disetujui oleh Green Light Committee (GLC) untuk perawatan 24,994 MDR-TB pasien. Strategi perencanaan 10 – tahun (tahun 2006-2015) kelompok kerja telah merencanakan secara global untuk menghentikan TB (WHO). Dari Provinsi Natal kwanulu, Afrika Selatan, ada 53 – 544 pasien di definisikan kasus extensively drug – resistant (XDR) – TB. Dari

52 – 53 pasien meninggal rata – rata dalam waktu 25 hari, yang sudah terapi antiretroviral (Kim SJ, *et al.*, 2005).

2.5 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis penyebab penyakit infeksi pada manusia mencapai 15% - 20%. Penyakit ini pada umumnya terjadi beberapa tahun setelah infeksi awal, ketika pasien dengan sistem imun mengalami penurunan, dalam beberapa reaksi presensi basil tuberkel dalam paru-paru. Penularan dari manusia ke manusia lain melalui inhalasi dengan adanya droplet yang mengandung organisme (aerosol menyebar 1 – 5 μm). Penularan penderita tuberkulosis paru melalui batuk, bersin, berbicara atau bernyanyi atau dalam proses penanganan spesimen klinis di laboratorium (Forbes BA, *et al.*, 2005).

2.6 Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis sebagai penyebab penyakit tuberkulosis, memiliki ciri sebagai berikut :

Morfologi : batang, nonmotile, ramping, lurus, atau sedikit bengkok dengan ujung bulat dan lebar bervariasi dari 0,3 – 0,6 μm , panjang 1 – 4 μm , tahan terhadap asam, tidak berspora dan tidak berkapsul. (Joklik, *et al.*, 1988). Tahan terhadap alkohol karena mempunyai banyak lipid (Sommers HM, 1985).

Fisiologi : *Mycobacterium tuberculosis* merupakan kuman obligat aerob dan tidak dapat tumbuh tanpa oksigen, sifat pertumbuhannya sangat

lambat meskipun dalam kondisi yang optimal untuk pertumbuhannya (Joklik, *et al.*, 1988). Karakteristik fisiologis yang berperan sebagai virulensi, dalam waktu 15-20 jam (Todar K, 2005), Pada media sederhana paling cepat tumbuh memerlukan waktu 2 – 3 hari, pada temperatur 20 – 40°C memerlukan waktu 2 – 6 minggu (Sommers HM, 1985). Pada identifikasi, isolasi *Mycobacterium tuberculosis* tergantung laju pertumbuhan koloni, tekstur koloni, pigmentasi, waktu inkubasi dan berpengaruh pada temperatur (Forbes BA, *et al.*, 2005).

Struktur dinding sel : dinding sel berisi beberapa lipid kompleks (Levinson W, 2004), mengandung polisakarida, protein dan polipeptida. Pada membran sitoplasma yang terdiri dari protein, bersifat antigenik, sifat antigenik tersebut ada yang bersifat spesifik, tetapi ada yang bersifat sebagai common antigen. Dinding sel dapat menyebabkan hipersensitif lambat dan beberapa infeksi diantaranya resisten (Jawetz, *et al.*, 2005). *Cord factor* (trehalose dimycolate) adalah organisme virulen, strain virulen tumbuh sebagai bentuk karakteristik " *serpentine* " yang dapat mengikat, sedangkan strain tidak virulen, tidak membentuk karakteristik. Organisme, berisi beberapa protein. Protein adalah antigen didalam purified protein derivative (PPD) pada tes kulit (Levinson W, 2004).

2.7 Faktor virulensi *Mycobacterium tuberculosis*

Faktor virulensi sampai saat ini masih belum diketahui pasti struktur dari *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan dalam timbulnya penyakit, sebab bakteri tersebut tidak memproduksi eksotosin maupun

endotoksin. Tetapi, ada beberapa hal tertentu yang diduga berhubungan dengan virulensi atau patogenisitas bakteri antara lain formasi Cord, tes niasin dan produksi katalase (Dzen SM, 2003). Virulensi *Mycobacterium tuberculosis* juga ditentukan dengan dapat tidaknya bakteri bermultiplikasi dalam sel epiteloid. H37Rv dan H37Ra sama-sama mempunyai kemampuan keluar dari fagolisosom. Setelah keluar dari fagolisosom, H37Rv dapat bermultiplikasi sedang H37Ra tidak terjadi multiplikasi (Zhang M, 1998). *Mycobacterium tuberculosis* dapat tetap dengan status laten pada periode lama dibawah kondisi karakteristik dengan tahap oksigen rendah, pH rendah dan nutrisi (Belisle JT, 2005).

2.8 Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

Sifat pertumbuhannya sangat lambat meskipun dalam kondisi optimal, dapat ditingkatkan dengan meningkatkan tekanan CO₂ 5%, dalam pertumbuhannya memerlukan pH optimal 7,0 tapi dapat tumbuh pada pH antara 6 – 7,6 dengan suhu optimal 37°C (Jolkik. *et al.*, 1988). Koloni tumbuh berwarna kuning tua, pada medium yang dapat menghambat pertumbuhan non *Mycobacterium tuberculosis*, koloni baru tumbuh selama 4 – 6 minggu (Todar K, 2005). Isolasi tergantung pada laju pertumbuhan, morfologi koloni, tekstur koloni, pigmentasi, dan temperatur pada inkubasi, identifikasi dilaksanakan dengan prosedur : kontrol kualitas organisme yang sudah diuji, biasanya digunakan strain yang dirawat dalam kaldu pada suhu-kamar dan dipindahkan tiap bulan. Dalam menentukan ukuran awal dari isolasi, pada umumnya cepat

menghasilkan koloni dalam waktu 3 - 4 hari setelah subkultur. Bahkan pada pertumbuhan ada yang lebih lama sampai 7 hari dari awal pertumbuhan koloni (Forbes BA, *et al.*, 2005). Dalam laju pertumbuhan memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan koloni yang matang, dari isolasi dengan koloni yang tampak besar pada media padat, bakteri *Mycobacterium tuberculosis* akan tumbuh membentuk koloni dalam waktu 7 hari ini termasuk pertumbuhan yang cepat, sedang untuk yang memerlukan waktu lebih lama termasuk pertumbuhan yang lambat (Vincent V, 1985).

Nutrisi : kebutuhan nutrisi pada basil tuberkel adalah prototrofik untuk semua asam amino, purin dan pyrimidin dan vitamin B-kompleks, setelah isolasi pertama, dapat menyesuaikan pertumbuhan pada larutan garam sederhana dengan ion ammonium sebagai sumber nitrogen dan glukose sebagai sumber karbon. Sumber karbon yang paling utama adalah glycerol dan asparagin yang lebih diperlukan sebagai sumber nitrogen (Jolkik, *et al.*, 1988).

2.9 Teknik Kultur pada Media :

2.9.1 Prinsip media agar Lowenstein – Jensen merupakan media selektif yang digunakan untuk penanaman bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, menggunakan tabung atau botol dengan media agar Lowenstein – Jensen dimiringkan. Pada umumnya penanaman *Mycobacterium* spesies, digunakan botol dengan area yang berdiameter 3 cm yang memiliki permukaan lebih besar untuk

memudahkan deteksi dan penghitungan koloni secara semi kuantitatif

Modifikasi dari International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) yang direkomendasikan bahwa medium Lowenstein – Jensen yang berisi glycerol menambah pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Media Lowenstein – Jensen memiliki nutrisi dengan komposisi sebagai berikut : larutan garam mineral adalah potassium dihydrogen phosphate anhydrous, magnesium sulphate, magnesium citrate, asparagin, glycerol, dan air suling. Disteril di otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Persiapan telur ayam, telur ayam yang baru tidak lebih dari usia tujuh hari kemudian dicuci dengan sabun dan masukkan kedalam methanol 70% selama 15 menit, telur dipecahkan secara aseptik dan ditampung dalam wadah steril. Telur tersebut dikocok secara steril sampai homogen. Telur yang telah homogen ditambahkan larutan hijau malaksit 2%. Medium telur kemudian dituang dengan volume 6 - 8 ml kedalam tabung steril 14 ml atau memakai botol McCartney 28 ml atau dalam volume 20 ml dalam botol yang berulir dengan ukuran 20x150 mm. Pembacaan kultur diamati setelah inkubasi pada hari ke 3 – 7 dan kemudian satu minggu sekali sampai dengan 6 – 8 minggu, sampai dianggap negatif apabila tetap tidak ada pertumbuhan (Kim SJ, *et al.*, 1998).

2.9.2 Prinsip media Middlebrook 7 H10 dan Middlebrook selektif 7H11 [S7H11]. Media Middlebrook 7 H10 atau 7H11 adalah kultur

tuberkulosis yang mengandung suplemen oleat albumin dekstrose agar (OADC) dengan komposisi sebagai berikut : larutan albumin fraksi V, sodium oleat, asam oleat dan larutan dekstrose. Prinsip larutan medium Middlebrook 7H10 dilarutkan dalam air suling yang mengandung gliserol. Suspensi tersebut disterilkan dengan otoklaf pada tekanan 121° C selama 10 menit. Media diletakkan di ruangan dalam temperatur dingin dan dipindahkan pada waterbath pada suhu 50–56 °C, tambahkan suplemen diatas sebanyak 20 ml, biarkan membeku pada temperatur kamar yang gelap. Penuangan media Middlebrook 7 H10 pada petri sebaiknya berisi lebih dari 20 ml karena inkubasi atau penyimpanan lebih lama, mengingat bahwa strain *Mycobacterium tuberculosis* tumbuh lebih lambat, diperlukan waktu untuk menghasilkan koloni 6 – 8 minggu, sampai dianggap negatif (Kim SJ, *et al.*, 1998).

2.9.3 Prinsip media BACTEC (Middlebrook 7H12) dan BACTEC 460 TB

Media BACTEC (Middlebrook 7H12) adalah medium liquid jauh lebih cepat menghasilkan pertumbuhan dibandingkan media padat dengan dikombinasikan untuk identifikasi spesies pada DNAny, mampu untuk menunjuk hasil deteksi *Mycobacterium tuberculosis* positif yang memerlukan waktu dua minggu untuk kebanyakan spesimen sputum BTA positif, dan dalam waktu tiga minggu untuk spesimen BTA negatif (Schluger, *et al.*, 2003). BACTEC 460 TB deteksi media padat dalam sistem ini kerja pertumbuhan

bandingkan dengan - intensif, dan medium kaldu berisi C14 (Woods, 2002).

Mycobacterium tuberculosis memiliki sifat-sifat biokimia sebagai berikut : Uji akumulasi niasin positif, uji reduksi nitrat memberikan hasil positif (Forbes BA, *et al.*, 2005). uji katalase dan uji peroksidase menunjukkan positif, (Vincent V, 1985., Levinson W, 2004).

2.9.4 Prinsip media Ogawa digunakan untuk kultur bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Botol yang digunakan untuk kultur pada media Ogawa dengan area permukaan lebih besar untuk mencapai tujuan semi kuantitatif. Medium ini lebih murah dibanding Löwenstein-Jensen sebab dibuat tanpa asparagin. Media padat Ogawa sebagai media kultur untuk pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, dengan komposisi sebagai berikut : larutan garam mineral, larutan hijau malaksit, telur ayam dan gliserol. Hasil medium dengan pH 6.8. Medium dicampur dengan baik dimasukan kedalam botol dengan volume 6 – 8 ml dalam 14 ml steril atau 28 ml botol McCartney atau dalam volume 20ml dalam 20 x 150 mm tabung test screw-capped. Tempatkan botol dalam posisi miring di inspissator dan dibekukan medium selama 45 menit pada 80°C - 85°C. Medium telah disiapkan secara steril, dengan pemanasan bertujuan untuk memadatkan medium. Pemanasan untuk ketiga kalinya mempunyai efek mutu medium. Mutu media telur tidak baik ketika koagulasi

dilaksanakan pada temperature terlalu tinggi atau waktu terlalu panjang. Mutu media yang kurang baik harus dibuang. Setelah inspisasi, keseluruhan media atau sampel yang mewakili kultur, harus diinkubasi pada 37°C selama 24 jam untuk cek sterilitas (Kim SJ, *et al.*, 1998).

2.10 Ketahanan *Mycobacterium tuberculosis*

Daya tahan *Mycobacterium tuberculosis* sangat tahan terhadap pemanasan. Bakteri ini mati dalam waktu 20 – 30 jam bila berada dalam sputum dan terkena sinar matahari secara langsung. Apabila berada pada sputum kering yang terlindung dari sinar matahari, akan bertahan hidup selama 6 – 8 bulan. Butiran – butiran sputum dalam debu akan tetap infeksius selama 8 – 10 hari. Pengaruh terhadap disinfektan dengan larutan 5% fenol akan mati dalam waktu 24 jam. Biakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam media perbenihan disimpan pada suhu 37°C tetap hidup tanpa kehilangan virulensi selama 12 tahun. Apabila *Mycobacterium tuberculosis* terkena sinar matahari secara langsung akan mati dalam waktu dua jam (Sjoekeer MD, 2003). Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat bersifat resistensi yang dipengaruhi oleh adanya enzim yang mampu memodifikasi obat seperti laktamase dan aminoglikosida asetiltransferase (Depkes RI, 2002).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

Lesi tuberkel pada tuberkulosis paru pertama terjadi pada *parenchyme* paru berupa lesi eksudatif dan dapat mengalir ke nodus getah bening, kelainan ini bersama – sama di sebut Ghon komplek (Levinson W, 2004).

Droplet nukleus ukuran 1 – 5 mikron yang dapat mencapai alveoli (Jolkik, *et al.*, 1988), sehingga dapat melewati sistem pertahanan muskositier bronkus dan terus berjalan sampai di alveolus dan menetap. Infeksi dimulai saat bakteri TBC berhasil berkembang biak dengan cara pembelahan diri di jaringan *parenchyme* paru yang mengakibatkan proses peradangan, pada mana terjadi peningkatan pembuluh darah atau aliran darah. Kondisi radang ini meningkatkan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dalam jaringan *parenchyme* paru, karena peningkatan aliran darah meningkatkan nutrisi, oksigen, karbon dioksida *growth* hormon yang sangat diperlukan untuk peningkatan pertumbuhan (Depkes RI, 2002).

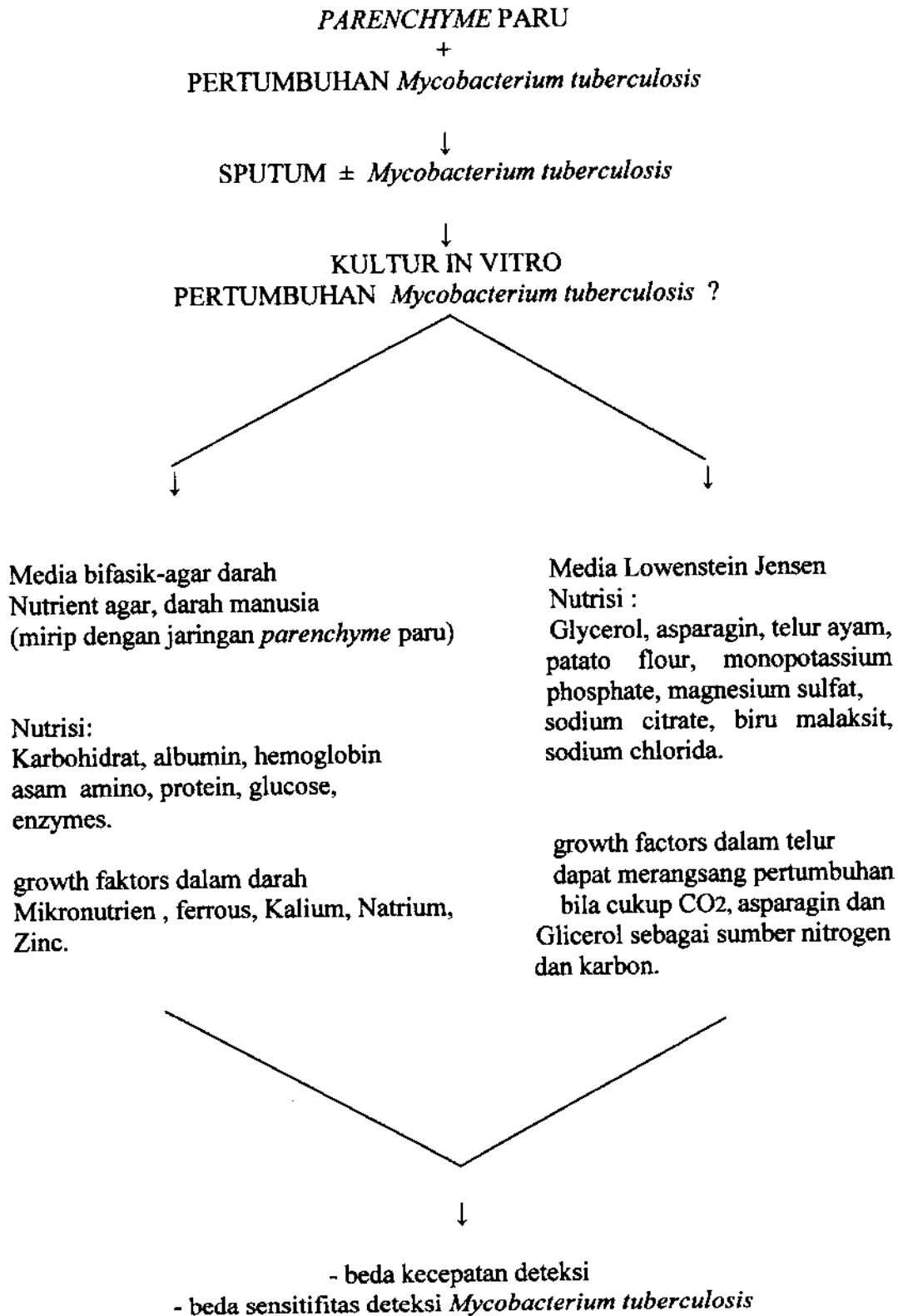
Pertumbuhan kultur *in vitro* bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam media Lowenstein – Jensen dengan komposisi : mengandung nutrisi yaitu patato flour, monopotasium phosphat, magnesium sulfat, sodium sitrat, biru malaksit, sodium klorida, asparadin dan gliserol yang digunakan sebagai sumber nitrogen dan karbon juga mengandung telur yang dapat merangsang pertumbuhan terutama diinkubasi dengan CO₂ yang cukup bagi pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* (Kim SJ, *et al.*, 1998).

Dalam media bifasik – agar darah dengan komposisi : adanya darah manusia yang mengandung asam amino, ferrous kalium, natrium, zinc, mikronutrien, protein, glucose *growth* hormon, enzim, yang mirip dengan kondisi aliran darah pada jaringan *parenchyme* paru, dibutuhkan mempercepat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Media agar padat membantu melekatkan pertumbuhan koloni karakteristik sehingga mudah dilakukan identifikasi.

Hipotesis Penelitian

1. Ada perbedaan sensitifitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum pada media bifasik–agar darah dengan media Lowenstein–Jensen.
2. Ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara media bifasik–agar darah dengan media Lowenstein–Jensen.

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini penelitian observasional deskriptif laboratorium, penelitian ini membandingkan hasil pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* antara metode kultur sputum pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel tergantung :

Pertumbuhan koloni kuman *Mycobacterium tuberculosis* pada media Lowenstein – Jensen dari kultur sputum suspek TB.

Pertumbuhan koloni kuman *Mycobacterium tuberculosis* pada media bifasik agar – darah dari kultur sputum suspek TB.

4.2.2 Variabel bebas : Sputum suspek TB

4.3 Devinisi Operasional

4.3.1 Pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari kultur sputum suspek TB paru pada media Lowenstein – Jensen :

Pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam pengamatan jumlah koloni yang tumbuh dengan karakteristik yaitu kering, kasar, putih krem, seperti bunga kol yang tumbuh pada media Lowenstein – Jensen. Waktu pengamatan satu minggu

sampai delapan minggu. Pada koloni karakteristik yang tumbuh dilakukan identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl Neelsen, uji akumulasi niasin, dan uji reduksi nitrat. Hasil pengamatan dinyatakan negatif, bila tidak ada pertumbuhan setelah pengamatan delapan minggu atau tidak teridentifikasi sebagai *Mycobacterium tuberculosis* (Forbes BA, et al., 2005).

- 4.3.2 Pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari kultur sputum suspek TB paru pada media bifasik agar – darah :
- Pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam pengamatan jumlah koloni yang tumbuh dengan karakteristik yaitu putih, kering, kasar, seperti bunga kol pada bagian miring dari agar padat nutrien pada media bifasik agar – darah. Waktu pengamatan tiga sampai tujuh hari. Pada koloni karakteristik yang tumbuh dilakukan identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl Neelsen. uji akumulasi niasin, dan uji reduksi nitrat. Hasil pengamatan dinyatakan negatif, bila tidak ada pertumbuhan setelah pengamatan delapan minggu atau tidak teridentifikasi sebagai *Mycobacterium tuberculosis* (Forbes BA, et al., 2005).

4.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian : Sputum suspek TB paru dari pasien yang berkunjung ke Poli Paru RSUD Dr. Soetomo.

Jumlah sampel penelitian adalah $n = 68$ sampel sputum

4.5 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari data primer dengan pengamatan hasil pertumbuhan kultur sputum antara metode kultur pada media Lowenstein – Jensen dengan media bifasik agar – darah, dicatat dan dibuat tabulasi data.

4.6 Analisis Data Penelitian

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan sensitifitas, antara metode kultur sputum dari hasil penelitian antara metode kultur pada media Lowenstein – Jensen dengan bifasik agar – darah dipergunakan uji statistik Mann – Whitney.

4.7 Tempat dan Waktu Penelitian

- Tempat penelitian dilakukan di dua tempat, yaitu :
 - * Di Poli Paru RSUD. Dr. Soetomo tempat melakukan pengambilan sampel penelitian.
 - * Di Laboratorium TDC UNAIR tempat melakukan dekontaminasi, pewarnaan dan kultur dari sampel pemeriksaan kultur sputum.
- Waktu Penelitian
 - * Penelitian akan dilakukan selama enam bulan, dari bulan Januari sampai dengan Juni tahun 2007.

Jadwal Waktu Penelitian

	Waktu penelitian (bulan)					
	I	II	III	IV	V	VI
1. Persiapan : perizinan tempat penelitian, persiapan peralatan dan reagensia, media.	√					
2. Penelitian : pengambilan sputum, pemeriksaan kultur sputum, pencatatan hasil penelitian.		√	√	√	√	
3. Tabulasi data penelitian, analisis data, penyusunan laporan hasil atau penyelesaian thesis.			√	√	√	√

4.8 Bahan, Reagensia, Peralatan dan Media.

4.8.1 Bahan pemeriksaan : sputum suspek TB dari Poli Paru RSUD Dr.

Soetomo

4.8.2 Reagensia

- Reagensia untuk dekontaminasi sputum : NaOH 4% dan larutan buffer fosfat dengan pH 7,4
- Reagensia untuk uji akumulasi niasin, uji reduksi nitrat, reagensia ZN (Standart DinKes Propinsi Jatim)

4.8.3 Media Kultur

Media agar Lowenstein – Jensen (Merck).

Media bifasik agar – darah : agar – nutrient miring (Oxoid) dan darah manusia (PMI, darah tidak kadaluarsa).

4.8.4 Peralatan

Pemusing dan tabung sentrifus steril (Nunc).

Gelas piala dan botol-botol steril.

Gelas slides

4.9 Prosedur Pemeriksaan Kultur

4.9.1 Preparasi Media Lowenstein – Jensen

Media agar base Lowenstein – Jensen (komersial Merck) ditimbang 37,5 g selanjutnya dilarutkan dalam 600 ml aquades (pH 7.0) sampai larut kemudian di lakukan sterilisasi dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selesai disterilisasi, didinginkan sampai suhu 50°C. Di siapkan telur yang sudah dicuci bersih dan direndam dalam alkohol 70% selama 10 – 15 menit. Telur satu persatu dipecah secara aseptik dan dimasuk telur dalam gelas ukur (1000 ml) yang steril, tuangkan telur kedalam beaker glass sampai volume 200 ml, kocok dengan mixer sampai homogen dan disaring dengan kasa steril. Dicampurkan kocokan telur kedalam larutan media agar base Lowenstein – Jensen yang sudah suhunya 40 – 50°C. Diaduk, kemudian bagi-bagikan dalam botol gelas (screw capped) untuk media kultur, dengan volume 10 ml untuk setiap botol. Tabung diletakkan dalam posisi miring 30°, dalam inspikator pada suhu 85°C selama 60 menit. Kemudian diletakkan dalam inkubator 37°C selama 18 – 24 jam, inspikasi dilakukan berulang tiga kali. Uji sterilitasnya dengan meletakkan media pada suhu 37°C selama satu hari, bila tidak terkontaminasi berarti steril, siap digunakan untuk media kultur.

4.9.2 Preparasi Media Bifasik Agar – Darah

Media bifasik agar – darah dibuat dengan modifikasi dari media nutrien – agar Oxoid yang ditimbang sebanyak 28 g, dilarutkan

dalam 1000 ml aquades (pH 7.0) dalam erlenmeyer lalu tutup rapat, media ini siap untuk disterilisasi dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selesai disteril media nutrisi – agar diangkat, didinginkan pada suhu mencapai 50°C, ditambahkan 10% serum manusia yang telah diinaktifkan 56°C selama 30 menit dan penisilin 100 units/ml, kemudian tuang 10 ml ke dalam botol gelas (screw capped dengan volume 50 ml). Botol diletakkan dengan kemiringan 30 derajat sampai menjadi padat. Kemudian dilakukan uji sterilitas media dengan inkubasi dalam inkubator 37°C selama satu hari, bila tidak terkontaminasi (steril) dapat dilanjutkan dengan penambahan darah PMI (anticoagulan EDTA) yang sudah diinaktifkan 50°C selama 30 menit, ditambahkan saponin 20%, kemudian diambil sebanyak 5 ml secara aseptik dimasukkan dalam media agar miring dengan posisi tegak. Uji sterilitas media bifasik agar – darah dilakukan dengan inkubasi dalam inkubator 37°C selama satu hari, bila tidak terjadi kekeruhan (steril) siap dilakukan penelitian kultur untuk sampel sputum.

4.9.3 Dekontaminasi dan Konsentrasi Sputum dengan NaOH (metode modifikasi Alkali Petroff, WHO).

Sputum pasien masukkan ke dalam tabung sentrifus sebanyak satu bagian dan ditambahkan dua bagian NaOH 4%, kontainer diberi label, tabung ditutup dengan rapat, dan dikocok supaya campur, Dibiarkan 15 menit pada temperatur kamar dengan sekali-kali dikocok, kemudian disentrifus pada 3000 x g dalam 15 menit,

tuang supernatan, dilakukan pembilasan sedimen dengan cara : tambahkan 15 ml phosphat buffer saline (PBS), dihomogenkan dengan vortex mixer selama 2 menit, dan selanjutnya disentrifus pada 3000 x g selama 15 menit. Tuang supernatan dan sedimen dibuat suspensi menjadi 200 μ l dan langsung diinokulasi ke medium kultur (secara duplo, 100 μ l untuk setiap botol media).

4.9.4 Kultur Sputum pada Media Lowenstein – Jensen

Sedimen hasil dekontaminasi dan konsentrasi sputum, sebanyak 100 μ l (secara duplo pada 2 botol media) diambil menggunakan mikropipet dengan yellow tip steril, ditanam pada permukaan media Lowenstein – Jensen, diratakan dipermukaan media dengan cara gerakan tabung mendatar gulir-gulir, kemudian diletakkan pada posisi kemiringan tabung 30 derajat dimasukkan dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 3 hari, kemudian botol ditegakkan, diinkubasi 37°C selama satu minggu sampai dengan delapan minggu. Pengamatan dilakukan pada hari ketiga, minggu pertama sampai dengan delapan minggu. Diamati pertumbuhan koloni karakteristik, kuning, kasar, putih krem seperti bunga kol, bila ada pertumbuhan koloni karakteristik, kasar, putih krem kemudian dilakukan identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl Neelsen basil tahan asam positif, uji akumulasi niasin positif dan uji reduksi nitrat positif. Dicatat positif kultur sputum dan dicatat waktu pertumbuhan, bila sampai delapan minggu tidak ada pertumbuhan di nyatakan negatif; dan bila ada kontaminan sampel

digagalkan sebagai sampel penelitian.

4.9.5 Kultur Sputum pada Media Bifasik Agar – Darah.

Sedimen hasil dekontaminasi dan konsentrasi sputum, diambil sebanyak 100µl (duplo pada 2 botol) menggunakan mikropipet dengan yellow tip steril, ditanam pada permukaan media bifasik agar – darah. Dimasukan inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 3 hari. Dilakukan penambahan sel eritrosit yang sudah lisis (penambahan saponin 20%) sebanyak 5 ml secara steril, pengamatan dilakukan pada hari ketiga dan minggu pertama. Pada minggu pertama, kemudian dilakukan sentrifus 3000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang menggunakan pipet pastur steril secara aseptik, kemudian dilanjutkan inkubasi sampai delapan minggu. Hasil positif bila ada pertumbuhan koloni karakteristik, kering, kasar, putih seperti bunga kol, dilakukan identifikasi mikroskopis pewarnaan Ziehl Neelsen basil tahan asam positif, uji akumulasi niasin positif dan uji reduksi nitrat positif. Dicatat positif kultur sputum dan dicatat waktu pertumbuhan, bila sampai delapan minggu tidak ada pertumbuhan di nyatakan negatif ; dan bila ada kontaminan sampel digagalkan sebagai sampel penelitian.

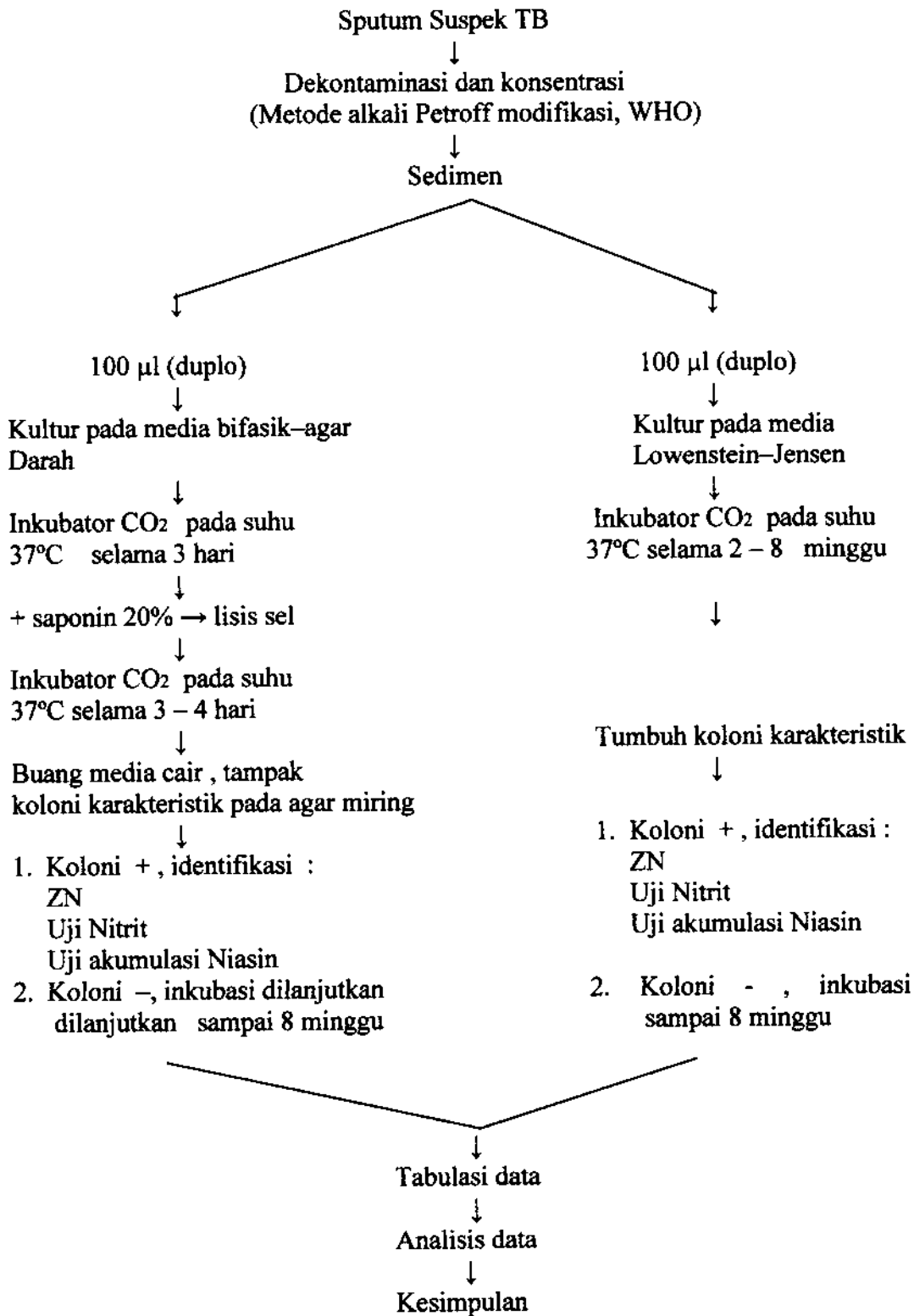
4.9.6 Menghitung Jumlah Koloni Berdasarkan Kriteria WHO :

<u>Pembacaan</u>	<u>Hasil</u>
Tidak tumbuh	Negatif
1 – 19 koloni	Positif (jumlah koloni)
20 – 100 koloni	Positif (1 +)
100 – 200 koloni	Positif (2 +)
200 – 500 koloni	Positif (3 +)
(Kim SJ, 1998)	

4.9.7 Kontrol Strain

1. Kontrol strain referens *Mycobacterium tuberculosis* dengan standart H 37 Rv (ATCC 27294) untuk setiap kali uji kultur
2. Strain referens *Escherichia coli* dengan standart (ATCC 10798)
3. Strain referens *Staphylococcus aureus* dengan standart (ATCC 12598) (Jonas V, 1993).

ALUR PENELITIAN



BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil penelitian pemeriksaan kultur sputum dari penderita tuberkulosis paru pada media bifasik agar – darah dan Lowenstein–Jensen.

Penelitian ini untuk mengetahui sensitifitas dan kecepatan pertumbuhan koloni untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan pemeriksaan metode kultur menggunakan media bifasik agar–darah yang dibandingkan dengan media Lowenstein – Jensen, telah dilakukan pada 68 sampel sputum dari 68 penderita tuberkulosis paru dari poli penyakit paru RSU Dr. Soetomo Surabaya, pada bulan Januari sampai dengan Juni 2007. Hasil dari penanaman 68 sampel sputum yang terdiri dari 32 sputum BTA negatif dan 36 sputum BTA positif dengan distribusi dapat dilihat pada tabel 5.1.

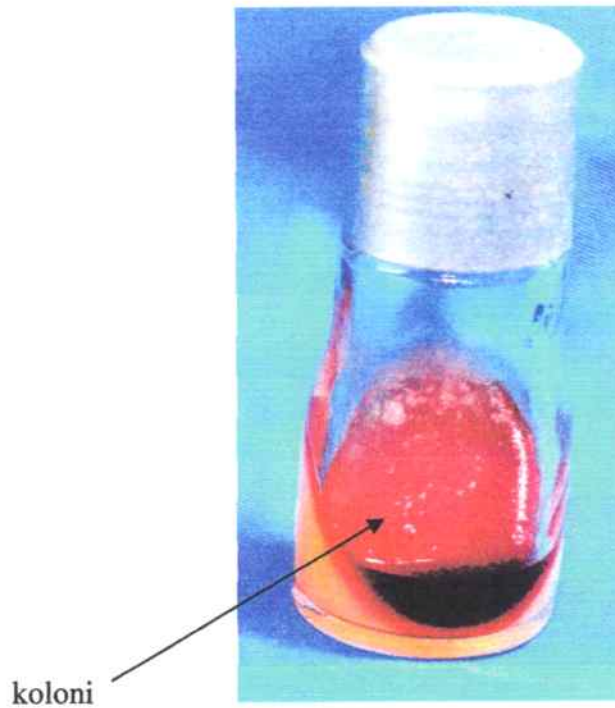
Tabel 5.1. Distribusi kultur dari 68 sampel sputum BTA negatif dan BTA positif.

Jenis sampel sputum BTA (-) / BTA(+)	Jumlah
BTA negatif	32
BTA positif (jumlah 36)	
BTA positif (1+)	15
BTA positif (2+)	11
BTA positif (3+)	10

Sampel sputum BTA negatif berjumlah 32, Sampel sputum BTA 1+ berjumlah 15, Sampel sputum BTA 2+ berjumlah 11, dan 10 sampel sputum BTA 3+ dari 68 penderita tuberkulosis paru pada bulan januari sampai dengan Juni 2007.

5.1.2 Hasil pemeriksaan kultur dan sampel sputum penderita tuberkulosis paru.

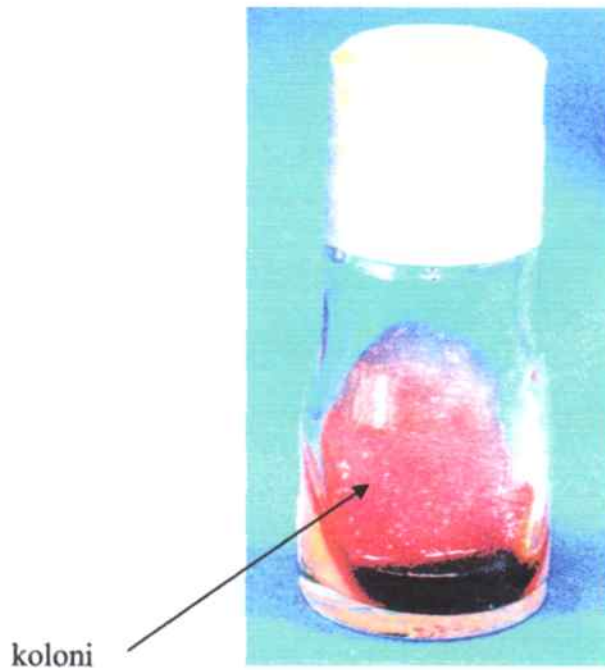
Media kultur bifasik agar–darah dan media Lowenstein–Jensen. Setelah sputum didekontaminasi dan disentrifus dengan metode modifikasi alkali Petroff (WHO) kemudian dibuat hapusan dari sedimen, dilanjutkan penanaman pada media kultur bifasik agar–darah dan media Lowenstein – Jensen. Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh menunjukkan masih ditemukan pertumbuhan koloni karakteristik dari teridentifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel sputum BTA negatif, pada media kultur bifasik agar–darah (gambar 5.1). Sedangkan pada media kultur Lowenstein–Jensen tidak ditemukan pertumbuhan sampai hari ke tujuh pengamatan. Pada media kultur bifasik agar – darah terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel sputum BTApositif (1+) pada pengamatan hari ke tujuh maupun ke tiga (gambar 5.2). Sedangkan pada media kultur Lowenstein – Jensen tidak ada pertumbuhan. Sedangkan pada sampel sputum BTA positif (2+ dan 3+) ditemukan pertumbuhan koloni karakteristik (gambar 5.3 dan 5.4), baik pada kedua jenis media, media kultur bifasik agar–darah maupun media Lowenstein – Jensen.



Gambar 5.1 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar – darah dari spesimen sputum BTA (-). Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh, tampak koloni karakteristik putih kasar. (tanda →).



Gambar 5.2 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar – darah dari spesimen sputum BTA (1+). Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh, tampak koloni karakteristik putih kasar. (tanda →).



Gambar 5.3 Hasil foto pertumbuhan koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar-darah dari spesimen sputum BTA (2+ dan 3+). Pada inkubasi dengan pengamatan hari ke tujuh, tampak koloni karakteristik putih kasar. (tanda →).

5.2 Analisa Hasil Penelitian

5.2.1 Perbandingan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara media kultur bifasik agar-darah dengan media Lowenstein – Jensen dalam waktu inkubasi dengan pengamatan hari ke tiga sampai hari ke tujuh (Tabel 5.2).

Tabel.5.2. Kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sputum pada media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen, dari sampel sputum BTA negatif (-) sampai BTA positif (+) pada hari ke tujuh inkubasi.

Hari	3		4		5		6		7		Total
Media	L-J +/Σ	Ba-d +/Σ	L-J +/Σ	Ba-d +/Σ	L-J +/Σ	Ba-d +/Σ	L-J +/Σ	Ba-d +/Σ	L-J +/Σ	Ba-d +/Σ	
BTA (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+25 (78,14%)	32
(1+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+11 (100%)	11
(2+)	-	-	-	-	-	+15 (100%)	-	+15 (100%)	-	+15 (100%)	15
(3+)	-	+10 (100%)	-	+10 (100%)	-	+10 (100%)	-	+10 (100%)	-	+10 (100%)	10
Total											68

Pada media kultur bifasik agar – darah dengan sampel sputum BTA negatif (-) ternyata masih dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* : 25 sampel sputum (78,14%) dari 32 sampel sputum pada inkubasi hari ke tujuh, dari

11 sampel sputum BTA positif (1+) menunjukkan 11 media ditemukan pertumbuhan pada inkubasi hari ke tujuh (100%), 15 sampel sputum BTA positif (2+) juga menunjukkan sudah ditemukan pertumbuhan pada inkubasi hari ke lima, 15 positif dari 15 sampel sputum (100%), sedangkan sampel sputum BTA positif (3+) juga menunjukkan 10 positif dari 10 sampel sputum (100%) sudah ditemukan pertumbuhan pada inkubasi hari ke tiga dilakukan Uji akumulasi Niasin dengan hasil positif, uji Nitrit dengan hasil positif dan katalase negatif. Sedangkan pada media kultur Lowenstein – Jensen dengan sampel sputum BTA negatif (-), dari 32 sampel semua tidak menunjukkan pertumbuhan koloni (0%) pada inkubasi hari ke tujuh, juga pada sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) dari 36 sampel sputum pada hari ke tujuh inkubasi sudah nampak pertumbuhan koloni – koloni kecil, namun koloni karakteristik belum terlihat sehingga belum bisa diuji identifikasi, setelah koloni karakteristik nampak dalam waktu dua minggu dari sampel sputum positif (3+), dilakukan Uji akumulasi Niasin dengan hasil positif, uji Nitrit dengan hasil positif dan katalase negatif, sedangkan dari sampel sputum positif (2+) koloni karakteristik nampak dalam waktu tiga sampai empat minggu juga dilakukan Uji akumulasi Niasin dengan hasil positif, uji Nitrit dengan hasil positif dan katalase negatif, dan dari sampel sputum positif (1+) koloni karakteristik nampak dalam waktu empat sampai enam minggu baru dilakukan Uji akumulasi Niasin dengan hasil positif, uji Nitrit dengan hasil positif.

Tabel.5.2. Hasil Uji Mann – Whitney untuk melihat perbedaan pertumbuhan kultur bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh.

	P	Arti
BTA (-)	0,000	Ada beda
(1+)	0,000	Ada beda
(2+)	0,000	Ada beda
(3+)	0,000	Ada beda

Hasil Uji Mann - Whitney perbedaan pertumbuhan kultur bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh, menunjukkan bahwa sampel sputum BTA negatif (-) dari media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen ada perbedaan, sedangkan sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) dari kedua media tersebut ada perbedaan dalam pertumbuhan koloni karakteristik.

Tabel.5.3. Hasil sensitivitas pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* antara media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh

Media	Bifasik agar – darah	Lowenstein – Jensen
BTA (-)	78,1%	0
(1+)	100%	0%
(2+)	100%	0%
(3+)	100%	0%

Pada pengamatan hari ke tujuh ada 32 sampel sputum BTA negatif masih dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada 25 sampel sputum (78,14%), sedangkan pada media Lowenstein – Jensen sampel tidak ada pertumbuhan. Pada 36 sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) pada pengamatan hari ke tujuh inkubasi (100%) semua terdeteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada media bifasik agar – darah, sedangkan pada media Lowenstein – Jensen dari 36 sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) tidak ditemukan pertumbuhan koloni (0%) pada pengamatan hari ke tujuh inkubasi sudah nampak pertumbuhan koloni – koloni kecil, namun koloni karakteristik belum terlihat sehingga masih menunggu pertumbuhan dua sampai enam minggu, semua yang tumbuh koloni karakteristik terdeteksi *Mycobacterium tuberculosis*.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penegakan diagnosis tuberkulosis paru pada program penanggulangan tuberkulosis di Indonesia terutama berdasarkan deteksi basil batang tahan asam BTA positif dari spesimen sputum 3x, sewaktu – pagi – sewaktu (S-P-S) secara mikroskopis, namun hal ini masih ada kendala sensitifitas walaupun hasilnya dapat diperoleh cepat dalam 10 menit sampai 20 menit.

Teknik deteksi mikroba penyebab infeksi yang lebih akurat dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis yaitu metode kultur, namun sampai saat ini metode kultur pada media padat masih terdapat kendala yaitu lamanya memperoleh hasil pemeriksaan. Oleh karena itu penelitian ini berdasarkan konseptual bahwa media cair dengan nutrisi lengkap untuk meningkatkan *growth rate* dapat meningkatkan sensitifitas deteksi mikroba dan kecepatan yang diperoleh dari hasil pemeriksaan.

Media darah untuk kultur mengandung nutrisi lengkap seperti habitat natural untuk pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* di jaringan *parenchyme* paru, juga mengandung oksigen dan karbon CO₂ yang tinggi, selain itu lengkap dengan faktor – faktor *growth* hormon dan enzim – enzim yang meningkatkan metabolisme sel atas dasar kondisi tersebut diharapkan metode kultur *Mycobacterium tuberculosis* dalam darah dapat meningkatkan sensitifitas deteksi dan kecepatan hasil pemeriksaan.

Kultur sputum dimulai dengan penanganan sputum yang benar atau akurat, karena sputum yang diperoleh dari teknik batuk dalam dan dikeluarkan dapat

diperoleh selain mikroba dari saluran bronkus juga flora normal yang ada disaluran nafas atas maupun rongga mulut. Berdasarkan hal ini, sputum spontan untuk kultur harus dilakukan proses dekontaminasi dan konsentrasi menggunakan metode modifikasi alkali Petroff (WHO). Alkali NaOH 4% dengan sama volume sputum, sehingga konsentrasi akhir NaOH 2%, ini dapat mematikan mikroba flora normal, sedangkan *Mycobacterium tuberculosis* tetap bertahan hidup. Selain itu NaOH berfungsi mengencerkan dahak atau sputum yang kental sehingga *Mycobacterium tuberculosis* terlepas dari lendir. Proses sentrifus mengakibatkan *Mycobacterium tuberculosis* terkonsentrasi di dasar tabung, sehingga sedimen lebih banyak mengandung *Mycobacterium tuberculosis*.

Sedimen ditanam 100 µl duplo pada media bifasik agar – darah dan juga duplo pada media Lowenstein – Jensen, agar meningkatkan kemungkinan deteksi *Mycobacterium tuberculosis*. Media bifasik agar – darah, media cair darah meningkatkan kecepatan pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, sedangkan media agar padat miring untuk menangkap sel – sel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan melekatkan pada permukaan media agar miring sehingga mudah dideteksi koloni karakteristik putih kasar sehingga dapat diidentifikasi lebih lanjut. Kelebihan lain dari media cair berupa darah dan agar miring ini diberi tambahan penisilin dimaksudkan untuk mematikan mikroba lain yang bukan *Mycobacterium tuberculosis*.

Kultur *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan media padat lempeng agar darah. selain itu media lempeng agar darah ini ditambahkan penisilin, Untuk menghambat pertumbuhan bakteri non karakteristik. Hasil penelitian menyatakan bahwa pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* lebih cepat pada media

lempeng agar darah dari pada media padat dengan dasar telur. Pada penelitian ini digunakan botol kultur, tidak menggunakan lempeng petri karena lebih kecil kemungkinan terjadi kontaminasi, hal ini juga dilakukan oleh peneliti terdahulu Kilicturgay, tahun 1977.

Selain itu juga dilakukan penelitian lain yang menggunakan botol kultur dengan media agar darah, tidak menggunakan lempeng petri. Pada penelitian ini mengatakan bahwa media dalam botol kultur untuk menjaga keseimbangan pertumbuhan koloni dan nutrisi, kemungkinan tidak akan terjadi kekeringan pada medium dan lebih kecil kemungkinan terjadi kontaminasi, hal ini dilakukan oleh Drancourt M, *et al.*, tahun 2003.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan media kultur Bifasik agar – darah yaitu memodifikasi media kultur dengan nutrien agar ditambahkan serum sebagai pengganti telur. Penambahan serum manusia juga karena kaya nutrisi seperti albumin, zat besi, asam amino, enzim – enzim.

Pada hari ke tiga inkubasi, saat kultur sputum ditambahkan dengan darah dan yang sudah ditambahkan dengan saponin 20% kemudian diinkubasi lebih lanjut sampai hari ke tujuh. untuk mengetahui sensitifitas dan kecepatan deteksi pertumbuhan koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*.

Penelitian ini dilakukan pemeriksaan dengan jumlah 68 sampel sputum BTA negatif dan positif (1+, 2+, 3+), dari 68 penderita tuberkulosis paru dari poli penyakit paru RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pada sampel sputum dilakukan dekontaminasi dan konsentrasi menggunakan metode modifikasi alkali Petroff (WHO). Sedimen dikultur sebanyak 100 µl diambil menggunakan mikropipet dengan *yellow tip* steril pada media bifasik agar – darah dan Lowenstein – Jensen.

Pada media Bifasik agar – darah dilakukan dengan cara sebagai berikut : ditanam pada permukaan media bifasik agar – darah yang sudah dilakukan uji sterilitas. Penanaman pada permukaan media nutrisi agar untuk memberi kesempatan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menempel pada permukaan media. Dilakukan inkubasi pada inkubator CO₂ dalam suhu 37°C selama tiga hari, kemudian diamati pada hari ke 3 dan selanjutnya ditambahkan darah yang sudah dicampur dengan saponin 20% untuk pertumbuhan koloni karakteristik, selanjutnya diinkubasi sampai hari ke 7, dalam pengamatan akan menunjukkan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis*.

Penambahan darah (PMI – EDTA) dimana anticoagulan – EDTA sebagai pencegahan pembekuan darah, tetapi anticoagulan – EDTA tidak berpengaruh pada pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (Priti K, *et al.*, 2000). Darah yang kaya akan mikronutrien, ferrous, kalium, natrium dan zinc sehingga dapat merangsang peningkatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* seperti terdapat pada penderita tuberkulosis. Selanjutnya ditambahkan saponin 20% yang bersifat untuk melisiskan darah dengan konsentrasi 20%, saponin dalam darah tidak mempengaruhi perubahan sel eritrosit, namun dapat melisiskan sel makrofag, sehingga *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler makrofag terbebas ke dalam cairan darah. Peranan saponin 20% dalam media kultur bifasik agar – darah pada kuman *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri patogen yang sangat mampu tumbuh di dalam sel (*facultative intracellular*) dalam tubuh inang, bakteri ini mampu melakukan multiplikasi atau bertahan, lama hidup dalam sel makrofag, apabila makrofag dilisis maka memungkinkan peningkatan

Mycobacterium tuberculosis terbebas dalam media cair darah (Anthony J, *et al.*, 2000).

Dari penelitian telah dilakukan dari pemeriksaan 68 sampel sputum yang didapatkan hasil sensitivitas dan kecepatan deteksi pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen dalam pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Hasil sensitivitas didapatkan sebagai berikut : pada media kultur bifasik agar–darah dengan spesimen sputum BTA negatif (-) menunjukkan : dari 32 sampel sputum, ditemukan pertumbuhan dalam jumlah 25 media (78,14%) pada inkubasi hari ke tujuh, dari 11 sampel sputum BTA positif (1+) menunjukkan 11 media ada pertumbuhan pada inkubasi hari ke tujuh, 15 sampel sputum BTA positif (2+) juga menunjukkan ada pertumbuhan pada inkubasi hari ke lima (100%) dan sampel sputum BTA positif (3+) juga menunjukkan (100%) ada pertumbuhan pada inkubasi hari ke tiga. Sedangkan pada media kultur menggunakan Lowenstein – Jensen dengan sampel sputum BTA negatif (-) menunjukkan : dari 32 sampel sputum semua tidak ditemukan pertumbuhan koloni (0%) pada inkubasi hari ke tujuh, dan dari 36 sampel sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) pada pengamatan hari ke tujuh juga sudah nampak pertumbuhan koloni kecil di permukaan media tetapi belum menunjukkan koloni karakteristik, untuk mendapatkan koloni karakteristik dari sampel sputum menunggu dua sampai enam minggu.

Hasil dari kecepatan deteksi pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen dalam pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. dilakukan uji statistik Mann-Whitney yang didapatkan sebagai

berikut : spesimen sputum BTA (-) ada perbedaan pertumbuhan pada media bifasik agar – darah lebih cepat tumbuh pada hari ke tujuh, sedangkan pada media Lowenstein – Jensen belum tumbuh. Spesimen sputum (1+, 2+, 3+) ada perbedaan dalam pertumbuhan pada media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen dalam inkubasi hari ke tujuh.

Perbedaan sensitifitas dan kecepatan deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kedua media kultur ini karena : media cair darah lebih tinggi dan lebih lengkap nutrisi, *growth* faktor O₂ dan CO₂ sehingga lebih meningkatkan *growth rate* *Mycobacterium tuberculosis* atau percepatan multiplikasi sel *Mycobacterium tuberculosis* dari pada nutrisi pada media padat Lowenstein – Jensen, selain itu media cair lebih menyebarkan paparan nutrisi kepada setiap sel *Mycobacterium tuberculosis* dari media padat, sedangkan media agar miring padat pada media bifasik agar – darah berguna melekatkan *Mycobacterium tuberculosis* yang bermultiplikasi menjadi banyak dan berat sehingga menumpuk pada permukaan media agar miring, yang memudahkan deteksi dan identifikasi selanjutnya.

Pada Hasil kultur media bifasik agar – darah dan media Lowenstein – Jensen yang tumbuh koloni karakteristik dan sediaan BTA dengan pewarnaan ZN (+), dilakukan identifikasi dengan uji akumulasi Niasin positif, uji Nitrit positif, dan katalase negatif.

Dalam penelitian ini juga dilakukan penanaman strain referensi untuk kontrol media kultur bifasik agar – darah dalam deteksi pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* juga dilakukan terhadap bakteri Gram negatif dan gram positif. Sebagai kontrol strain digunakan yaitu strain referensi *Mycobacterium tuberculosis* dengan standart H 37 Rv (ATCC 27294) ditemukan

ada pertumbuhan koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* pada media kultur bifasik agar – darah, sedangkan pada kontrol bakteri Gram negatif digunakan strain referensi *Escherichia coli* dengan standart (ATCC 10798) dalam penanaman kultur tidak ditemukan pertumbuhan koloni pada media kultur bifasik agar – darah dan selanjutnya pada kontrol gram positif digunakan strain referensi *Staphylococcus aureus* dengan standart (ATCC 12598) dalam penanaman kultur juga tidak ditemukan pertumbuhan koloni pada media kultur bifasik agar – darah.

Kelebihan media bifasik agar – darah pada penelitian ini juga terbukti kemampuan selektifitasnya, karena penambahan penisilin yang bersifat dapat mematikan Gram negatif dan Gram positif yang berasal dari sampel sputum.

Berdasarkan beberapa kelebihan media bifasik agar – darah baik sensitifitas, mampu dalam kecepatan deteksi *Mycobacterium tuberculosis*, selain itu juga selektifitasnya, maka diharapkan bermanfaat untuk menegakan diagnosis tuberkulosis secara rutin di laboratorium mikrobiologi.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

- 7.1.1 Ada perbedaan sensitivitas deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur sputum antara media bifasik agar darah dengan Lowenstein – Jensen. Pada penelitian ini ternyata kultur pada media bifasik agar darah memiliki kelebihan dibanding kultur pada media Lowenstein – Jensen. Pada pengamatan hari ketujuh dari 32 sampel sputum BTA negatif (-) masih dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* 25 sampel (78,14%); dan pada 36 sampel sputum. deteksi pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* dari kultur sputum BTA positif (1+, 2+, 3+) 100%, pada pengamatan hari ke tiga sampai ke tujuh. Pada media Lowenstein-Jensen dari 32 sampel sputum BTA negatif (-) 0 % dan 36 sampel sputum BTA positif masih belum dapat dideteksi *Mycobacterium tuberculosis* sampai pengamatan hari ketujuh.
- 7.1.2 Ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* antara kultur sampel sputum pada media bifasik agar-darah dengan media Lowenstein-Jensen. Media kultur bifasik agar-darah lebih cepat dibanding dengan kultur media Lowenstein-Jensen untuk mendeteksi adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Waktu yang diperlukan pada media bifasik agar-darah adalah sampai 7 hari dibanding 14 sampai 42 hari yang diperlukan oleh media Lowenstein – Jensen.

7.2 Saran

- 7.2.1. Penelitian lanjut untuk melengkapi uji validitas internal maupun eksternal dari penelitian ini.
- 7.2.2. Hasil penelitian selanjutnya adalah dilengkapi uji validitas, diharapkan metode kultur pada media bifasik agar – darah dapat digunakan secara rutin untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis.
- 7.2.3. Media kultur pada media bifasik agar-darah dapat diteliti untuk kegunaan uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti-tuberkulosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony J. A. Wright,• Paul M. Finglas, and Susan Southon., 2000, Erythrocyte Folate Analysis: Saponin Added During Lysis of Whole Blood Can Increase Apparent Folate Concentrations, Depending on Hemolysate pH, *Clinical Chemistry* 46:12, 1978–1986., 26/06/2007 12:57
- Belisle JT, Braunstein M, Rosenkrands I, and Andersen P., 2005, The Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in cole ST, Eisenach KD, Murray DN, Jacobs WR, Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, American Society for Microbiology, chapter 16 hlm 235 – 260.
- Blumberg HM, Leonard MK, 2006 . Pulmonary Tuberculosis, Tuberculosis: Forms of Tuberculosis, Infectious Disease Society American Thoracic Society: treatment of tuberculosis. 167(4): 603 – 662.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, 2005. Mikobakteria dalam : Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiologi). Jawetz, Melnick & Adelberg's. Salemba Medika, FK Unair. hlm. 453 – 470.
- Clark-Curtiss JE, Haydel SE, 2003. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*; 57: 517 - 549.
- Departemen Kesehatan RI, 2002. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis, cetakan ke 8. Jakarta. hlm. 1 – 36.
- Drancourt, M., P. Carrieri, M. Gevaudan, and D. Raoult. 2003. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis* : the end of a dogma. *J. Clin. Microbiol.* 41:1710-1811. 19/12/2006 11:13
- Drancourt, M., P. Carrieri, M. Gevaudan, and D. Raoult. 2003. Blood agar, Chocolate agar, and *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 41, No. 8. 19/12/2006 11:13
- Dzen SM, Roskistiningsih, Sanarto S, Sri W, 2003. Bakteriologi Medik, bayumedia Publishing, FK Unbra. hlm. 293 – 316.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, 2005. Mycobacteria. In : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11 th ed. Mosby. St Louis, pp. 538 – 571.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, 2005. Laboratory cultivation and isolation of bacteria. In : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11 th ed. Mosby. St Louis, pp. 133 – 146.

- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C, 2003. Tuberculosis. *Lancet.* ; 362 (9387): 887 - 899.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, 1988. *Mycobacterium* in : Zinsser Mikrobiologi. 19 th edition. Appleton & Lange. California , pp. 423 - 448.
- Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM and Moore DF, 1993. Detection and Identification of Mycobacterium tuberculosis Directly from Sputum Sediments By Amplification of Rna, *Journal of Clinical Mikrobiologi.* 31(9): 2410 – 2416. 21/12/2006 7:23
- Kim SJ, Frieden T, Luelmo F, Norval PY, Rieder H, Valenzuela P, Weyer K, 1998. Laboratory Services in Tuberculosis Control, Culture part III, WHO, geneva, Switzerland. Pp.11 – 85.
- Kiliertugay, K., E. Gumrukcu, F. Tubluk, and M. Saglam, 1977. The results in our tuberculosis laboratory with penicillin blood agar medium. *Mikrobiol. Bul.* 11:29-33.
- Levinson W., 2004, Mycobacteria, Review of Medical Microbiology and Immunology, ed. 9, Lange Medical Books, hlm. 161 -168.
- Monack DM, Mueller A, Falkow S, 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*; 2(9): 747 - 765.
- Priti K, Vijaya S., 2000. Ethyleneglycol-Bis-(b-Aminoethylether)Tetraacetate as a Blood Anticoagulant: Preservation of Antigen-Presenting Cell Function and Antigen-Specific Proliferative Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Stored Blood., *American Society for Microbiology.* p. 578–583 Vol. 7, No. 4
- Sandjaja B.,1995. Perbenihan Mikobakteria dalam : Isolasi dan Identifikasi Mikobakteria. cetakan II. Widya Medika Jakarta. hlm 57 – 66 .
- Schluger NW The diagnosis of tuberculosis: what's old, what's new. *Semin Respir Infect.* 2003; 18(4): 241 - 248.
- Sommers HM, Good RC., 1985, Mycobacterium in Lennette EH, Balow A, Hausler WJ, Shadony HJ, Manual of clinical Microbiology, Chapter 22 hlm 216 – 248.
- Todar K , 2005. Tuberculosis, Bacteriology .University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>., 23/02/2007 12:57

Tolan RW, Barton LL, Windle ML, 2006. Tuberculosis in: Immunology and Infectious Diseases, Children's Hospital of Michigan and Wayne State University, American Academy of Pediatrics

Vincent V, Brown EBA, Jost KC, and Wallace RJ., 1985, Mycobacterium : Phenotypic and Genotypic Identification, in Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH, Manual of Clinical Microbiology, Ed 8, Vol 1, hlm 560 – 584.

Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T Clinical evaluation of difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 1997; 35(1): 121 – 124

Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes PF, 1998. Growth of Virulent and Avirulent Mycobacterium tuberculosis Strains in: Human Macrophages, *Infection and Immunity*, 66 (2):794 – 799.

Lampiran 1

Hasil pemeriksaan media kultur bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel sputum BTA negatif pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh

Waktu inkubasi	No	media bifasik agar – darah	media Lowenstein – Jensen
Hari ke tujuh	1	7 CFU/ml	-
	2	5 CFU/ml	-
	3	7 CFU/ml	-
	4	5 CFU/ml	-
	5	5 CFU/ml	-
	6	-	-
	7	5 CFU/ml	-
	8	5 CFU/ml	-
	9	5 CFU/ml	-
	10	7 CFU/ml	-
	11	7 CFU/ml	-
	12	-	-
	13	3 CFU/ml	-
	14	5 CFU/ml	-
	15	3 CFU/ml	-
	16	-	-
	17	7 CFU/ml	-
	18	5 CFU/ml	-
	19	3 CFU/ml	-
	20	4 CFU/ml	-
	21	3 CFU/ml	-
	22	-	-
	23	-	-
	24	4 CFU/ml	-
	25	6 CFU/ml	-
	26	3 CFU/ml	-
	27	-	-
	28	-	-
	29	5 CFU/ml	-
	30	3 CFU/ml	-
	31	7 CFU/ml	-
	32	4 CFU/ml	-

Hasil uji pertumbuhan kultur *Mycobacterium tuberculosis* antara media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen, dari sampel sputum BTA positif (1+) pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh

Waktu inkubasi	No	media bifasik agar – darah	media Lowenstein – Jensen
Hari ke tujuh	1	10 CFU/ml	-
	2	10 CFU/ml	-
	3	8 CFU/ml	-
	4	5 CFU/ml	-
	5	10 CFU/ml	-
	6	5 CFU/ml	-
	7	10 CFU/ml	-
	8	5 CFU/ml	-
	9	10 CFU/ml	-
	10	10 CFU/ml	-
	11	8 CFU/ml	-

Hasil uji pertumbuhan kultur *Mycobacterium tuberculosis* antara media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen, dari sampel sputum BTA positif (2+) pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh

Waktu inkubasi	No	media bifasik agar – darah	media Lowenstein – Jensen
Hari ke tujuh	1	10 CFU/ml	-
	2	10 CFU/ml	-
	3	12 CFU/ml	-
	4	10 CFU/ml	-
	5	14 CFU/ml	-
	6	10 CFU/ml	-
	7	10 CFU/ml	-
	8	12 CFU/ml	-
	9	15 CFU/ml	-
	10	10 CFU/ml	-
	11	13 CFU/ml	-
	12	14 CFU/ml	-
	13	13 CFU/ml	-
	14	12 CFU/ml	-
	15	15 CFU/ml	-

Hasil uji pertumbuhan kultur *Mycobacterium tuberculosis* antara media bifasik agar – darah dengan media Lowenstein – Jensen, dari sampel sputum BTA positif (3+) pengamatan pada inkubasi hari ke tujuh

Waktu inkubasi	No	media bifasik agar – darah	media Lowenstein – Jensen
Hari ke tujuh	1	20 CFU/ml	-
	2	20 CFU/ml	-
	3	20 CFU/ml	-
	4	10 CFU/ml	-
	5	15 CFU/ml	-
	6	20 CFU/ml	-
	7	15 CFU/ml	-
	8	20 CFU/ml	-
	9	25 CFU/ml	-
	10	20 CFU/ml	-

Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Pertumbuhan koloni karakteristik pada media Lowenstein – Jensen :

- Tingkat pertumbuhan lambat (hari ke tujuh)
- Tumbuh pada temperatur 35° sampai 37°C
- Tidak berpigmen (kuning)
- Tes Niasin positif
- Tes Nitrit positif
- Tes katalase negatif pada 68°C dengan pH 7.0

Pertumbuhan koloni karakteristik pada media bifasik agar – darah :

- Tingkat pertumbuhan lambat (hari ke tujuh)
- Tumbuh pada temperatur 35° sampai 37°C
- Tidak berpigmen (putih)
- Tes Niasin positif
- Tes Nitrit positif
- Tes katalase negatif pada 68°C dengan pH 7.0

Penelitian Pendahuluan

Penanaman strain referens *Mycobacterium tuberculosis* dengan standart H37Rv (ATCC 27294).

strain *Mycobacterium tuberculosis* dengan standart H37Rv (ATCC 27294) dilarutkan pada media middlebrook 7H9 (9 ml : 1) setara dengan penghitungan Mc.Farland 1 (1.5×10^6 CFU/ml) dengan pengenceran dilusi sampai (1.5×10^1 CFU/ml).

