

## SENSITIVITAS MEDIA OGAWA DAN MEDIA LOWENSTEIN JENSEN TERHADAP HASIL PERTUMBUHAN KUMAN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Pancawati Ariami, Maruni Wiwin Diarti, Yunan Jiwintarum

**Abstract:** Referring to the national TB control program, the diagnosis made by microscopic examination of sputum by direct and definitive diagnosis by culture examination. Direct sputum examination is the gold standard method of microscopic examination of a recognized WHO TB and confirmation done by the method of culture. Research "Sensitivity Test Using Ogawa Medium and Lowenstein Jensen Medium Against *Mycobacterium tuberculosis* Bacteria Growth Results", performed to identify and compare the results of Ogawa medium and culture on Lowenstein-Jensen medium and analyze the sensitivity between the two medium. A descriptive observational study was conducted. Study sample is a sample saturated with a consecutive sampling. Sample size retrieval technique based on sample collection time, which is June 8 through July 18, 2011, a total of 53 samples. Research is to test the sensitivity variables as independent variables and the growth of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on the Ogawa medium and LJ medium as a bound variable. The results of the study, of 53 samples, 21 (39.6%) samples were negative, so that 32 (60.4%) samples tested positive for *M tuberculosis* and the total growth of 36 samples (67.9%). Lowenstein Jensen (LJ) medium is more sensitive than the Ogawa medium, both in terms of speed of growth and in the number of colonies that grow. For the determination of *Mycobacterium* species needs to be done other tests to confirm. Culture results can also be used for comparison using the PCR method, OAT resistance by culture methods.

**Kata Kunci:** Sensitivity Ogawa Medium, Lowenstein Jenses Medium, The Growth Of M Tuberculosis

### LATAR BELAKANG

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*) diperkirakan menginfeksi sepertiga penduduk dunia, 75% termasuk dalam usia produktif (15-50 tahun). WHO memperkirakan bahwa di Indonesia setiap tahun terjadi 583.000 kasus baru dan menyebabkan kematian sekitar 140.000 (Depkes R I, 2000). Menurut laporan WHO, penyakit TB Paru di Indonesia tercatat 320 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 1991, 300 per 100.000 pada tahun 1992 dan 247 kasus pada tahun 1993. Perkiraan angka kejadian untuk semua golongan umur pada tahun 2000 dan 2005 adalah 243 dan 247 per 100.000 penduduk. Selanjutnya berdasarkan hasil Riskesdas tahun 2010 bahwa periode *prevalence* TB Paru

2009/2010 adalah sebesar 725/100.000 penduduk. Lima provinsi yang memiliki angka prevalensi TB paling tinggi adalah: Papua 1.441 per 100.000 penduduk, Banten 1.282 per 100.000 penduduk, Sulawesi Utara 1.221 per 100.000 penduduk, Gorontalo 1.200 per 100.000 penduduk dan DKI Jakarta 1.032 per 100.000 penduduk (Asa, 2005; Riskesdas, 2010).

Provinsi NTB merupakan salah satu dari 33 provinsi yang merupakan daerah indikator pencapaian *Milleneum Development Goals* (MDGs) bidang kesehatan pada riset kesehatan dasar (Riskesdas) tahun 2010. Periode *prevalence* TB di NTB 0,927% dan periode suspek TB adalah 2,877% (Riskesdas, 2010). Di kabupaten Lombok Timur menurut laporan Dikes Lotim bidang P2PL tahun

2010 cakupan penemuan penderita baru BTA (+) adalah 763 (34%) meningkat dari cakupan tahun 2009 sebanyak 32%. Puskesmas Dasan Lekong merupakan salah satu puskesmas di Lombok Timur dengan jumlah suspek penderita TB 619 orang dengan pemeriksaan mikroskopis BTA (+) 62 orang (Dikes Lotim, 2010).

Diagnosis tuberkulosis (TB) paru ditegakkan berdasarkan gambaran klinik, pemeriksaan fisik, gambaran radiologik, pemeriksaan laboratorium dan uji tuberkulin (Retno, 2011). Diagnosis laboratorium tuberkulosis (TB) paru yang rutin dilaksanakan adalah tehnik mikroskopis BTA, dan untuk konfirmasi dilakukan kultur. Rangkaian pemeriksaan identifikasi *M tuberculosis* dalam sekret atau jaringan merupakan hal utama dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis namun mempunyai keterbatasan. Pulasan BTA secara mikroskopis dapat mendeteksi kurang lebih 5000 kuman/ml sputum, sedangkan metode kultur dengan 50 – 100 kuman/ml sputum sudah dapat tumbuh (Retno, 2011). Tehnik mikroskopis relatif cepat, tapi sensitivitas dan spesivitas relatif rendah dibanding dengan tehnik kultur (Kalma, 2003). Tanoue *et. al.* (2002) telah melakukan penelitian pada 53 strain *M tuberculosis* untuk mengevaluasi konsistensi tes kerentanan menggunakan dua media kultur padat berbasis telur, Ogawa dan Lowenstein-Jensen (LJ). Penelitian dilaksanakan untuk menilai perbedaan antar media dalam tes kerentanan untuk obat anti TB terhadap isoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin, dan obat alternatif lain.

Media LJ digunakan untuk diagnosis infeksi *Mycobacterium*, uji kerentanan antibiotik terhadap

isolat, membedakan perbedaan spesies *Mycobacterium* (berupa morfologi koloni, kecepatan pertumbuhan, karakteristik biokimia, dan mikroskopis). Media LJ lebih dikenal untuk kultur *Mycobacterium*, seperti direkomendasikan oleh *International Union Against Tuberculosis (IUAT)*. (Wikipedia, *the free encyclopedia*).

Media Ogawa lebih murah dibandingkan dengan Lowenstein-Jensen karena dibuat tanpa asparagin. Kandungan garam-garam mineral yang telah dicampur dapat disimpan lama sedangkan campuran pewarna tidak dapat disimpan lama karena mengendap atau berubah menjadi larutan yang berwarna sangat pucat (Weyer *et. al.*, 2006). Pemeriksaan sputum secara langsung dengan metode mikroskopis merupakan *gold standart* pemeriksaan TB yang diakui *WHO*. Uji konfirmasi dilakukan dengan metode kultur. Walaupun banyak jenis kultur yang dapat digunakan untuk mengkultur kuman *M tuberculosis*, namun media Ogawa dan LJ secara rutin lebih disukai dan lebih sering dilaksanakan.

Kuman *M tuberculosis* yang sering kontak dengan OAT dapat berubah bentuk (*fragmented*), sehingga sulit atau bahkan tidak dapat diamati secara mikroskopis sehingga dilaporkan sebagai TB negatif. TB secara mikroskopis negatif bukan berarti kuman *M tuberculosis* sudah mati. Hal ini dapat dikonfirmasi dengan metode lain, misalnya dengan mengkultur kuman. Media Ogawa dan LJ dapat juga digunakan untuk menguji kerentanan pertumbuhan kuman *M tuberculosis* terhadap OAT. Metode kultur adalah metode yang paling murah setelah mikroskopis namun memerlukan waktu lama. Sedangkan metode

lain (ELISA, PCR) lebih efisien dari sisi waktu namun biaya pemeriksaan tinggi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif, dengan populasi/sampel adalah semua penderita TB paru yang dinyatakan positif secara mikroskopis. Ukuran sampel penelitian berdasarkan waktu pengumpulan, yaitu sampel penderita TB paru yang dinyatakan positif secara mikroskopis, yaitu sebanyak 53 sampel yang dikumpulkan tanggal 8 Juni sampai dengan 18 Juli 2011. Teknik sampling dengan *consecutive sampling*, yaitu penderita suspek TB yang dinyatakan positif secara mikroskopis dan bersedia dengan menandatangani *inform consent*.

**Cara Pengumpulan Data, berdasarkan data primer berupa** hasil identifikasi sputum dengan pulasan BTA (mikroskopis langsung) dari penderita suspek TB Paru yang dinyatakan positif secara mikroskopis dengan pewarnaan BTA dengan metode *Ziehl Neelsen*. Data lain adalah hasil identifikasi sputum berupa pertumbuhan kuman *M tuberculosis* yang diperoleh dari kultur pada media Ogawa dan media LJ dari penderita TB paru serta membedakan hasil pembiakan pada kedua media berdasarkan morfologi koloni dan kecepatan pertumbuhan kuman pada media kultur.

**Analisis Data.** Data tentang hasil identifikasi sputum dengan pulasan BTA (mikroskopis langsung) pada penderita suspek TB Paru dilakukan dengan mengumpulkan hasil pemeriksaan mikroskopis dari pewarnaan sputum BTA dengan metode *Ziehl Neelsen* diperoleh sebanyak 53 sampel dibuat

persentase antara data sebelum dan sesudah pengolahan sputum. Data tentang perbandingan hasil kultur sputum pada media Ogawa dan media LJ berdasarkan morfologi koloni dan kecepatan pertumbuhan kuman. Data tentang hasil uji sensitivitas pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada media Ogawa dan media LJ. Sensitivitas media LJ dihitung dengan cara

$$\frac{(+)\text{ LJ}}{(+)\text{ Ogawa}} \times 100\%$$

### Rincian cara kerja :

**Pengambilan sputum untuk BTA.** Sebelum mengeluarkan sputum, pasien disuruh untuk berkumur-kumur dengan air dan pasien harus melepas gigi palsu(bila ada). Sputum diambil dari batuk pertama (*first cough*). Cara membatukkan sputum: Tarik nafas dalam dan kuat (dengan pernafasan dada), batukkan kuat sputum dari bronkus, trakea, mulut, wadah penampung. Periksa sputum yang dibatukkan, bila ternyata yang dibatukkan adalah air liur/saliva, maka pasien harus mengulangi membatukkan sputum. Sebaiknya, pilih sputum yang mengandung unsur-unsur khusus, seperti, butir keju, darah dan unsur-unsur lain. Bila sputum susah keluar, lakukan perawatan mulut. Perawatan mulut dilakukan dengan obat glyseril guayakolat(*expectorant*) 200 mg atau dengan mengonsumsi air teh manis saat malam sebelum pengambilan sputum. Bila sputum juga tidak bisa didahakkan, sputum dapat diambil secara aspirasi *transtracheal*, *bronchial lavage*, *lung biopsy*.(Sumber: <http://www.scribd.com>)

**Pengolahan sputum dan dekontaminasi.** Sampel sputum dijaga dari ada atau tidaknya BTA dengan metode *Ziehl Neelsen (ZN)*. Sampel dicampur dengan *vortex* dan dibagi sama banyak dalam 2 bagian. Satu bagian sampel diproses dengan menambahkan 4 bagian NaOH 4% pada satu bagian sputum dan dicampur pada posisi tegak lurus selama 15 menit. Campuran tadi diambil 0.1 ml yang langsung diinokulasi pada 2 tabung media Ogawa 3%. Setengah lainnya diproses dengan menambahkan volume sama banyak NaOH 4% dan dihomogenisasi dengan *vortex* selama 15 menit. Buffer phosphate (pH 6.8) ditambahkan untuk menetralsir larutan, kemudian diputar pada 3000 rpm selama 15 menit dan supernatant dibuang. Dengan menggunakan inoculum 0,1 ml sedimen diinokulasi kedalam 2 tabung medium LJ. Semua tabung kultur diinkubasi pada 37°C dan diamati setiap hari dari minggu pertama masa inkubasi sampai akhir minggu ke-8. (Sumber: Ang *et. al.*, 2011).

**Metode kultur dengan menggunakan medium Ogawa 3%.** Prosedur untuk mempersiapkan biakan media Ogawa 3% berdasarkan pada petunjuk yang tersedia dalam buku pedoman, *Minimum Essentials of Laboratory Procedures for Tuberculosis Control* oleh *the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association*. KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 3 gram dan 1 gram Natrium glutamate (vetsin) dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest dan disterilkan pada 121°C selama 15 menit. Ditambahkan 6 ml glycerol dan *malachite green* 2% dalam larutan garam dingin. Ditambahkan 200 ml telur yang telah dihomogenkan dengan menambahkan larutan dan dicampur dengan hati-hati. Setelah dihomogenisasi,

medium kasar dibagikan ke dalam tabung bertutup. Tabung kultur dipanaskan pada 90°C selama 1 jam. (Sumber: Ang *et. al.*, 2011)

**Metode kultur dengan menggunakan medium Lowenstein Jensen (LJ).** Medium Lowenstein Jensen dipersiapkan menurut petunjuk pabrik (BBL, Merck). Medium pembiakan disiapkan dengan menimbang 18.65 gram medium dasar LJ dan dilarutkan ke dalam 300 ml aquadest. Ditambahkan 6 ml glycerol dan 10 ml larutan malachite green 2%. Larutan disterilkan dalam *autoclaved* pada 121°C selama 30 menit dan didinginkan. Ditambahkan telur yang telah dihomogenkan 500 ml dan dicampurkan. Medium dibagikan ke dalam tabung bertutup alur sebanyak 6-8 ml. Tabung biakan ini dipanaskan pada 85°C selama 50 menit. Untuk mengecek sterilitas, disiapkan media pembiakan dengan menginkubasi pada 37°C selama 48 jam dan disimpan dalam *refrigerator* bila tidak ada kontaminan yang terdeteksi. Semua tabung ditutup dengan ketat untuk mencegah penguapan selama penyimpanan. (Sumber: Ang *et. al.*, 2011)

**Tabel 1 Pembacaan hasil kultur**

PEMBACAAN	PENCATATAN
> 500 koloni	+4
200 – 500 koloni	+3
100 – 200 koloni	+2
20 – 100 koloni	+1
1 – 19 koloni	Jumlah koloni
Tidak ada pertumbuhan	Negatif

Keterangan:

- Bila terdapat kontaminasi pada kultur, segera laporkan dan ulangi pembuatan kultur

- Bila kultur positif dan pertumbuhan dinilai sebagai *M tuberculosis*, segera laporkan pada pihak berkepentingan.
  - Pada minggu ke-4 dapat dibuat laporan sementara.
  - Pada minggu ke-8 dibuat laporan akhir
- (Sumber: Sjahrurachman, 2008)

## HASIL PENELITIAN

### Identifikasi sputum pada penderita TB paru dengan metode kultur pada media Ogawa dan media Lowenstein-Jensen (LJ)

Pengambilan sampel sputum penderita adalah sebagian besar sputum pagi dari penderita kasus baru yang dinyatakan positif secara mikroskopis. Sampel dikumpulkan sejak 8 Juni sampai dengan 18 Juli 2011 yang diperoleh dari Puskesmas Masbagik, Dasan Lekong, Wanasaba, Labuan Lombok, Keruak, Terara, Aikmel, Selong, Denggen, Lepak, Sakra, Korleko, Rensing, Lendang Nangka kabupaten Lombok Timur, dan Puskesmas Gerung Lombok Barat. Sampel dihomogenisasi pada tanggal 30 Juli 2011 dan pada tanggal 3 Agustus 2011 dikultur pada media Ogawa dan Lowenstein-Jensen (LJ). Sampel yang terkumpul sebanyak 56, 3 diantaranya dinyatakan *drop out* (sampel no 23, 51, dan 52) karena identitas sampel tidak jelas.

Hasil homogenisasi sputum di bagi tiga (3) yaitu 1 *effendorf* untuk kultur dan dua *effendorf* lain untuk ekstraksi DNA untuk pemeriksaan resistensi primer *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik *nested PCR*. Hasil homogenisasi dapat dilanjutkan pemeriksaan langsung atau disimpan dalam lemari es suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sputum yang telah dihomogenisasi

untuk pemeriksaan kultur maupun PCR di cuci dengan menggunakan pZ steril sebanyak 3 kali dan di cek pH 7,0.

Pada 53 sampel dikultur disertai dengan kontrol negatif pada media Ogawa & LJ, diperoleh 21 (39,6%) sampel negatif sehingga 32 (60,4%) sampel dinyatakan positif *M tuberculosis* secara kultur. Pertumbuhan koloni baik yang termasuk *M tuberculosis complex* maupun non TB serta kontaminan & jamur sebanyak 36 sampel (67,9%). Berdasarkan morfologi koloni pada media Ogawa dan LJ, maka yang termasuk *M tuberculosis complex* 32/34 (94,1%) pada media LJ, dan 26/29 (89,7%) pada media Ogawa.

### Perbandingan hasil kultur media Ogawa dan media Lowenstein-Jensen terhadap hasil pertumbuhan kuman *M tuberculosis*

Media yang sudah diinokulasi diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan diamati sampai minggu ke-8. Pada sampel sputum penderita yang pernah mendapat pengobatan obat anti tuberculosis (OAT), bila kultur negatif sampai minggu ke-8, maka inkubasi kultur dilanjutkan hingga minggu ke-12. Beberapa nomor sampel ditemukan *rapid grower*. Hasil pengamatan pada minggu ke-2 dan ke-3, seperti pada tabel 2 dan 3.

**Tabel 2. Pertumbuhan koloni hasil kultur sputum pada minggu ke-2**

No	No & kode sampel	Pertumbuhan
1	Og 2, LJ 2	Koloni disekitar cairan biakan berwarna kuning pucat
2	Og 7	Koloni tumbuh di atas permukaan cairan biakan berwarna kuning pucat, warna media di sekitar koloni menjadi hijau tua.
3	LJ 9	Koloni kuning cerah, mengkilat, <i>smooth</i> .
4	LJ 16	Koloni kuning cerah, mengkilat, <i>smooth</i> . Koloni tumbuh diatas permukaan cairan, menyebabkan warna media menjadi hijau tua
5	LJ 19	Jamur
6	LJ 24	Koloni kuning muda diatas permukaan cairan biakan, warna biakan menjadi hijau tua
7	Og 31	Jamur, koloni bagian tengah timbul, berlipat, dan berkerut di tengah
8	LJ 37	Koloni merah, penuh dipermukaan media, warna media menjadi kuning
9	Og 45	Koloni kuning terang, <i>smooth</i> , besar, warna media menjadi hijau tua
10	LJ 49	Koloni kuning pucat, <i>smooth</i> kecil2, di permukaan media

**Tabel 3. Pertumbuhan koloni hasil kultur sputum pada minggu ke-3**

No	No & kode sampel	Pertumbuhan
1	Og 2, LJ 2	Koloni kuning pucat
2	LJ 3	Koloni bulat, mengkilat, <i>smooth</i> , kuning pucat
3	Og 7	Jamur
4	LJ 9	Koloni kuning terang, mengkilat, <i>smooth</i>
5	LJ 12	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil
6	Og 16	Koloni kuning pucat
7	LJ 16	Koloni terang
8	Og 17	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil
9	LJ 17	Koloni kuning pucat
10	LJ 19	Jamur, putih seperti kapas
11	LJ 21	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil
12	Og 24	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil
13	LJ 24	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil, jamur
14	Og & LJ 25	Jamur
15	Og & LJ 30	Koloni kuning pucat, sedikit
16	Og 31	Koloni kuning pucat, +2, jamur (+)
17	LJ 31	Koloni kuning pucat, +2
18	LJ 35	Koloni kuning pucat
19	Og & LJ 36	Koloni kuning pucat, kusam, kecil-kecil
20	Og 37	Koloni kuning terang
21	LJ 37	Koloni merah
22	Og & LJ 39	Koloni kuning, koloni Og < LJ
23	Og 45	Koloni jamur kuning menyebar, 1 koloni kuning mengkilat, koloni kusam bertumpuk
24	Og & LJ 49	Koloni kuning, Og < LJ
25	Og & LJ 54	Koloni kuning, sedikit

Pada beberapa media LJ maupun Ogawa terdapat juga pertumbuhan jamur maupun kuman kontaminan lain, seperti terlihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Media yang ditumbuhi jamur (media no 24, tabung paling kiri)**

Sampai minggu ke-12 pertumbuhan kuman pada media yang masih negatif tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni (tetap negatif). Foto hasil kultur negatif dan positif 1- 4, seperti pada Gambar 2.

Perbandingan pertumbuhan koloni dari hasil kultur pada media Ogawa dan media LJ, ternyata lebih sensitif pertumbuhan pada media LJ dibandingkan dengan pertumbuhan koloni kuman pada media Ogawa. Beberapa contoh perbandingan hasil kultur sputum dari penderita TB paru, bahwa sampel no LJ 49: koloni tumbuh pada minggu ke-2, pada media Ogawa baru tumbuh pada minggu ke-3. Sampel no 47 & 46: koloni kuman mulai tumbuh pada minggu ke-4, tapi jumlah koloni berbeda kedua media yang dipergunakan.



**Gambar 2. Hasil kultur berturut-turut dari kiri ke kanan: negatif, positif 1, Positif 2, positif 3, dan positif 4.**

Persentase pertumbuhan koloni pada media Ogawa pada minggu pertama sebesar 11,1% (4/36), dan pertumbuhan terus meningkat sampai minggu ke-8 mencapai 80,6% (29/36). Sedangkan pertumbuhan koloni pada media LJ di minggu pertama sama banyak dengan pertumbuhan koloni di Ogawa yaitu 11,1% dan mencapai puncak pertumbuhan sampai minggu ke-6 sebesar 94,4% (34/36). Sensitivitas antara media Ogawa dan media LJ terhadap pertumbuhan koloni dari kultur sputum penderita TB paru dapat diperhatikan pada Tabel 3.5 dan data selengkapnya dapat diamati pada Lampiran 3: Tabel perbandingan hasil kultur positif antara media Ogawa dan media LJ dari penderita TB paru. Sedangkan sensitivitas diantara kedua media kultur dapat diamati pada Tabel 3.3 dibawah ini:

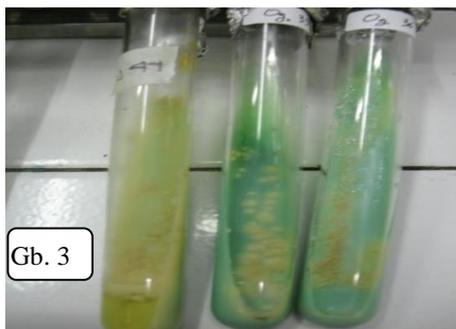
**Tabel 3. Sensitivitas antara media Ogawa dan media LJ terhadap pertumbuhan koloni dari kultur sputum penderita TB paru**

Minggu ke-	%ase pertumbuhan koloni pada media	
	Ogawa	Lowenstein Jensen
1	11,1	11,1
2	19,4	25,0
3	47,2	63,9
4	63,9	86,1
5	66,7	88,9
6	75,0	94,4
7	77,8	94,4
8	80,6	94,4

**Analisa hasil uji sensitivitas menggunakan media Ogawa dan media LJ terhadap pertumbuhan kuman *M tuberculosis***

Berdasarkan kecepatan tumbuh dan jenis pigmen, Mycobacterium yang diperoleh dari hasil kultur termasuk pada :

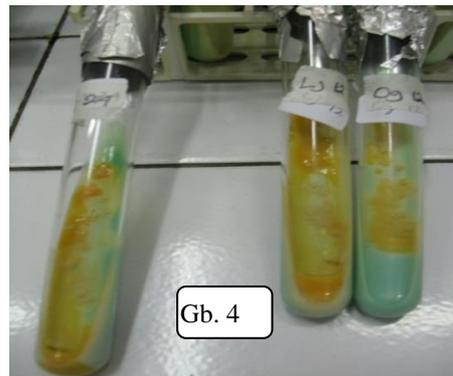
a. *Non photochromogen* (tanpa pigmen pada koloni) adalah ditemukan pada hampir semua biakan, kecuali yang tidak disebutkan pada golongan *Rapid Grower*. Koloni kuman yang termasuk pada *non photochromogen* seperti yang terlihat pada Gambar 3.



**Gambar 3. Koloni campuran non photochromogen**

b. *Scotochromogen* (dengan pigmen koloni kuning atau orange). Koloni kuman akan berwarna jika diinkubasi dalam keadaan gelap. Ditemukan pada 6 sampel no sampel: 9, 12, 21, 24, 40, 45. Dari

ke-6 sampel, hanya sampel no 9 dan 45 yang merupakan koloni tunggal *scotochromogen*; sedangkan sampel no 12, 21, 24, dan 40, pertumbuhan koloni ada 2 macam, yaitu yang termasuk *non photochromogen* dan *scotochromogen*, seperti yang dapat diamati pada Gambar 4.



**Gambar 4. Koloni campuran non photochromogen dan scotochromogen**

c. *Rapid grower*, diantaranya adalah *M flavescens*, *M thermoresistibile*, *M marinum*, *M fortuitum-chelonae complex*. Kebanyakan kuman golongan ini berasal dari golongan non pathogen bagi manusia.

Koloni kuman yang termasuk *rapid grower* biasanya akan tampak dalam waktu 1 minggu; ditemukan pada no sampel 6, 27, dan 36 pada media LJ dan Ogawa; no 31 (hanya di media Ogawa); no 37 (hanya di media LJ) .

**PEMBAHASAN**

Pemeriksaan dengan cara kultur lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan pemeriksaan sputum secara mikroskopis. Melalui pemeriksaan kultur, diferensiasi antara bakteri mati dan hidup serta diferensiasi antara *M tuberculosis*

dan NTM dapat dilakukan. Selain itu pada isolat yang ditemukan, dapat dilakukan uji kepekaan sehingga akan mampu memandu pengobatan lebih baik. Untuk mendapatkan 50% kesempatan BTA positif diperlukan kuman BTA pada sputum 1000 kuman per ml, sementara dengan tehnik kultur yang baik hasil positif dapat terjadi walau kuman hidup berkisar antara 10-100 kuman per ml. Pada pemeriksaan mikroskopis langsung, hasil positif pada mayoritas kasus baru terjadi jika jumlah kuman per ml sputum minimal 5000 kuman, sementara untuk kultur diperlukan 1000 kuman. Pada umumnya biakan sputum akan meningkatkan penemuan kasus sekitar 20 – 30% dari jumlah keseluruhan TB paru BTA positif. Oleh sebab itu, pemeriksaan kultur sangat sangat bermanfaat untuk kasus *paucibasile* seperti pada kasus TB ekstra paru, TB anak, dan TB sistemik (Sjahrurachman, 2008).

Biakan sputum merupakan suatu metode pemeriksaan yang kompleks, membutuhkan sarana, prasarana, dan peralatan yang lebih mahal dan pemeriksaan mikroskopis langsung. Indikasi utama melakukan pemeriksaan kultur apabila tiga kali BTA negatif, sedang yang bersangkutan dicurigai TB karena mempunyai gejala saluran pernafasan, tersangka TB pada anak, spesimen berasal dari ekstra paru, dari seorang tersangka TB, semua yang berkaitan dengan TB-HIV.

Hal lain yang mengindikasikan diagnosis TB dengan kultur adalah kontak dekat dengan pasien BTA positif, tersangka pasien gagal obat, pasien DOTS kategori-1 paduan jangka pendek dengan BTA positif pada akhir bulan-5 atau akhir bulan-6, tersangka pasien gagal, pasien DOTS kategori-2

paduan jangka pendek dengan BTA positif pada akhir bulan-5 atau akhir bulan-8, kambuh, evaluasi pengobatan MDR/XDR (Sjahrurachman, 2008).

Mycobacteria merupakan mikroba tahan asam, serupa dengan rhodococcus dan Nocardia. Tingkat ketahanan Mycobacteria terhadap asam bervariasi. Mycobacteria ada yang bersifat pathogen dan ada juga yang tidak pathogen. Mycobacteria tidak pathogen mudah ditemukan di lingkungan manusia, khususnya dalam air. Mycobacteria lingkungan ini merupakan cemaran yang harus diantisipasi agar tidak mengacaukan hasil pemeriksaan kultur dan uji kepekaan (Sjahrurachman, 2008).

Mycobacteria yang secara medis penting adalah *M tuberculosis*, *M bovis*, *M africanum*, *M microtii*, *M ulcerans*, *M leprae*, *M kansasii*, *M marinum*, *M simiae*, *M scrofulaceum*, *M szulgai*, *M xenopi*, *M gordonae*, *M flavescens*, *M fortuitum-chelonae complex*, *M avium-intracelluler complex*, dan *M terra-triviale complex*. Empat spesies pertama termasuk pada *M tuberculosis complex*.

Berdasarkan sudut pandang kecepatan tumbuh dan jenis pigmen, dua parameter yang mudah diamati pada pemeriksaan kultur, Mycobacterium secara sederhana dibagi atas:

- a. *Photochromogen* dengan pigmen koloni kuning, jika inkubasi dilakukan dengan pencahayaan. Termasuk dalam golongan ini adalah *M kansasii*, *M marinum*, *M simiae*, dan *M asiaticum*.
- b. *Non photochromogen* (tanpa pigmen pada koloni) adalah *M tuberculosis complex*, *M terrae complex*, *M gastrii*, *M malmoense*, *M avium complex*, *M haemophilum*, *M xenopi*.

- c. *Scotochromogen* (dengan pigmen koloni kuning atau orange). Koloni kuman akan berwarna jika diinkubasi dalam keadaan gelap. Yang termasuk golongan ini adalah *M szulgai*, *M flavescens*, *M thermoresistible*, *M gordonae*, *M scrofulaceum*, *M xenopi*.
- d. *Rapid grower*, diantaranya adalah *M flavescens*, *M thermiresistible*, *M marinum*, *M fortuitum-chelonae complex*. Kebanyakan kuman golongan ini berasal dari golongan non patogen bagi manusia.

Kuman yang tidak termasuk *rapid grower* mempunyai waktu pembelahan puluhan jam, sehingga koloni yang diisolasi dari specimen ini biasanya mulai tampak setelah 2 minggu. Sementara koloni kuman yang termasuk *rapid grower* biasanya akan tampak dalam waktu 1 minggu (Sjahrurachman, 2008).

Kebanyakan bahan pemeriksaan kultur *Mycobacteria* mengandung banyak kuman cemaran. Tidak satupun senyawa penghambat yang dapat menjamin 100% kuman cemaran akan mati. Beberapa kuman resisten seperti *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Bacillus*, dan jamur masih dapat tumbuh pada media kultur. Angka kejadian cemaran pasca inokulasi antara 3-5% merupakan hal yang wajar. Jika pengolahan bahan tidak baik atau pengirim terlambat, angka cemaran dapat mencapai 10% atau lebih. Sebaliknya tidak pernah teramatinya cemaran, juga merupakan tanda kurang baik. Tidak adanya cemaran sama sekali kemungkinan akibat pengolahan bahan yang terlalu keras atau lama, dengan konsekuensi adalah *isolation rate M tuberculosis* juga akan berkurang (Sjahrurachman, 2008). Pada penelitian ini kuman cemaran terdeteksi total sebanyak 9/53 (17%).

Sedangkan terdeteksinya pertumbuhan kultur kontaminan, yaitu meleburnya sebagian media pada pertumbuhan awal (Hari pertama setelah masa inkubasi) ditemukan pada 5 sampel 5/53 (9,4%) semua pada media LJ, yaitu sampel no 47, 35, 16, 6, dan 5. Tingginya angka cemaran (kontaminan) pada hasil pertumbuhan sputum kultur kemungkinan disebabkan oleh jarak waktu pengumpulan sampel dan pengolahan sputum.

Prinsip kultur dan identifikasi *Mycobacteria* dimulai dengan menilai waktu pertumbuhan, warna pigmen, morfologi koloni, dan hasil pewarnaan BTA. Identifikasi yang lebih rinci dilakukan dengan berbagai uji biokimia, uji toleransi pada 5% NaCl atau hambatan oleh *thiophene 2 carboxylic acid hydrazine* (TCH), uji pertumbuhan pada media *Mc Conkey* tanpa kristal violet, uji molekuler, kromatografi cair atau tekanan tinggi. Uji biokimia yang dipakai untuk identifikasi spesies *Mycobacteria* antara lain: uji niasin, uji reduksi nitrat, uji katalase, uji katalase tahan panas, uji hidrolisa *tween*, uji urease, uji *arilsulfatase*, uji *iron uptake*, uji penggunaan sitrat, uji penggunaan inositol, uji penggunaan manitol, uji pirazinamidase, uji reduksi telurit (Sjahrurachman, 2008). Penilaian hasil identifikasi kultur pada penelitian ini didasarkan pada waktu pertumbuhan, warna pigmen, dan morfologi koloni baik pada media Ogawa maupun pada media LJ.

Koloni *M tuberculosis* yang tumbuh pada media perbenihan mempunyai sifat tidak terjadi perubahan warna koloni setelah terpapar cahaya, uji akumulasi niasin positif, uji reduksi nitrat positif, uji katalase tahan panas 68<sup>0</sup>C negatif, dan uji PNB negatif. Jika fasilitas laboratorium tidak memadai, identifikasi *M tuberculosis* minimal didasarkan pada

hasil pewarnaan, kecepatan tumbuh, morfologi koloni, uji PNB, dan salah satu uji dari niasin, reduksi nitrat, katalase tahan panas (Sjahrurachman, 2008).

Adapun ciri-ciri *M tuberculosis* merupakan sel berbentuk batang lurus, berukuran 0,4 x 3 um. Kuman tidak berspora dan tidak berkapsul. Pada pewarnaan ZN tampak kuman berwarna merah dengan latar belakang biru. Pada pewarnaan fluorokrom berfluoresensi dengan warna kuning jingga. Kuman sulit diwarnai dengan cat Gram, tapi bila berhasil maka hasilnya adalah Gram positif. Pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron memperlihatkan dinding sel yang tebal, mesosom yang mengandung lemak (lipid). Kandungan lemak pada kuman ini besar, yaitu lebih dari 25% dibandingkan kuman Gram positif yang hanya 0,5% dan kuman Gram negatif 3%. Besarnya kandungan lipid memberikan sifat khas pada *Mycobacterium*, yaitu tahan terhadap kekeringan, alkohol, zat asam, alkali, dan germisida tertentu. Menurut Barsdake dan Kim, sifat tahan asam dari *Mycobacterium* oleh perangkat fuksin intrasel, suatu pertahanan yang dihasilkan dari kompleks mikolat fuksin yang terbentuk di dinding sel (Anonim, 2009).

Pertumbuhan kuman *Mycobacterium* sangat lambat, waktu pembelahan adalah 12-18 jam dengan suhu pertumbuhan optimum 37°C. Kuman dapat tumbuh pada media buatan yang sederhana, tapi pertumbuhan kuman yang diisolasi dari bahan klinik membutuhkan media kompleks. Pada perbenihan, pertumbuhan tampak setelah 2-3 minggu, membentuk koloni cembung, kering, warna kuning gading. *Mycobacterium* mengandung sejumlah besar

kompleks lemak dengan berat molekul tinggi, antara lain 'mycosid' *D wax*, *trehalose-6, 6-dimycolate*, dan sulfolipid. Mikosid adalah seri dari asam mikolat yang mengandung glikolipid atau glikolipid peptide, terdistribusi secara khas diantara spesies *Mycobacterium* yang berbeda. Beberapa mikosid terdapat di lapisan luar permukaan sel dan berperan sebagai reseptor bakteriofag. *D wax* adalah suatu substansi yang terdiri dari asam mikolat, peptida, dan polisakarida. Substansi ini mempunyai sifat 'adjuvant' yang khas, antara lain: dapat meningkatkan produksi antibody untuk melawan antigen proteinyang digabungkan dalam emulsi minyak *D wax* menginduksi respon imun seluler (*cell mediated immune/CMI*). Oleh karena sifat inilah, maka *D wax* ikut berperan terhadap patogenitas tuberkulosa melalui peningkatan respon *CMI* (terutama hipersensitivitas tipe lambat) untuk melawan protein *Mycobacterium*. Penelitian menunjukkan bahwa komponen akhir *D wax* adalah N-acetyl muramil dipeptida (Anonim, 2009).

'*Cord factor*' berhubungan erat dengan virulensi kuman TB dimana pada kultur membentuk '*serpentine cord*', yaitu susunan paralel dari kuman. Pembentukan '*cord*' ini dihubungkan dengan adanya glikolipid trehalose-6,6-mikolat yang berlokasi di bagian perifer organisme. Sejumlah respon biologik dapat ditimbulkan oleh material ini, antara lain bersifat toksik terhadap tikus, menghambat migrasi leukosit polimorfonuklear, menginduksi perlindungan terhadap infeksi kuman virulen dan menginduksi pembentukan granuloma (Anonim, 2009).

Sulfalipid adalah suatu glikolipid yang berlokasi di perifer, material yang dapat memberikan respon berupa pengikatan pewarnaan merah netral pada galur *M tuberculosis* yang virulen. Walaupun sulfolipid sendiri tidak bersifat toksik, tetapi bila digabungkan dengan 'cord factor' dapat memperkuat sifat toksik 'cord factor' (Anonim, 2009).

Tidak semua orang menjadi sakit walaupun mendapat infeksi. Status infeksi suatu masyarakat dapat diketahui dengan tes tuberkulin pada kulit. Kalau tes tuberkulin positif dianggap seseorang telah terinfeksi oleh basil tuberculosis. Dalam hal ini masih terdapat kekecualian seperti terjadinya reaksi false positif dan false negatif seperti reaksi positif setelah mendapat vaksinasi BCG ataupun reaksi positif akibat infeksi oleh *Mycobacterium atipik* (Anonim, 2009).

Diagnosis definitif tuberculosis ditentukan dengan menumbuhkan *M. tuberculosis* pada media kultur dan diidentifikasi dengan menggunakan uji diferensial *in vitro*. Banyak media yang berbeda telah dirancang untuk kultur basil tuberkel dan diidentifikasi dalam tiga kelompok utama, yaitu media yang berbasis telur, media berbasis agar dan media cair (Walt, 2011).

Media yang ideal untuk isolasi basil tuberkel harus ekonomis dan sederhana untuk dipersiapkan dari bahan-bahan tersedia, dapat menghambat pertumbuhan kontaminan, mendukung pertumbuhan sejumlah kecil basil dan memberi diferensiasi awal isolat berdasarkan morfologi koloni. Untuk kultur spesimen sputum, media berbasis telur harus menjadi pilihan utama, karena memenuhi semua persyaratan ini. Hal ini meningkatkan bukti bahwa media cair dapat memberikan hasil yang lebih baik dengan spesimen

lainnya. Walaupun dapat menekan biaya penggunaan rutin dengan spesimen sputum, dianjurkan bahwa kedua media berbasis telur dan media cair dapat digunakan untuk spesimen non-berulang (spesimen tunggal), misalnya. cairan serebrospinal dan hasil biopsi. Disarankan bahwa spesimen sputum semua kultur juga dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis (Walt, 2011).

Persiapan media berbasis telur, media Lowenstein-Jensen (LJ) merupakan media yang paling banyak digunakan untuk kultur tuberculosis. Dianjurkan menggunakan modifikasi dari *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. Media LJ mengandung bahan yang diperlukan untuk pertumbuhan *M. tuberculosis* sementara media LJ tanpa gliserol tapi mengandung piruvat mendorong pertumbuhan *M. bovis*. Keduanya harus digunakan di negara-negara atau wilayah pasien yang mungkin terinfeksi dengan baik oleh organisme ini (Walt, 2011).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Penentuan pertumbuhan koloni berdasarkan morfologi koloni, kecepatan tumbuh, dan jenis pigmen yang terbentuk. Sampel penderita TB paru yang positif secara mikroskopis sebanyak 53 dikultur pada media Ogawa dan media Lowenstein Jensen (LJ). Sejumlah 21 (39,6%) sampel negative, 32 (60,4%) sampel dinyatakan positif *M tuberculosis complex*. Total pertumbuhan koloni baik *M tuberculosis complex*, non TB, kontaminan & jamur sebanyak 36 sampel (67,9%). Berdasarkan morfologi koloni pada media Ogawa dan LJ, maka yang termasuk *M tuberculosis complex* 32/34 (94,1%)

pada media LJ, dan 26/29 (89,7%) pada media Ogawa.

2. Persentase pertumbuhan koloni pada media Ogawa dan LJ pada minggu pertama sama, sebesar 11,1% (4/36). Pertumbuhan terus meningkat sampai minggu ke-8 mencapai 80,6% (29/36) pada Ogawa. Sedangkan pertumbuhan koloni pada media LJ mencapai puncak pertumbuhan pada minggu ke-6 sebesar 94,4% (34/36).
3. Sensitivitas diantara kedua media yang dipergunakan menyatakan bahwa media LJ lebih sensitif daripada media Ogawa, baik dari sisi kecepatan tumbuh maupun jumlah koloni yang tumbuh.

#### Saran

1. Penentuan koloni *M tuberculosis complex* dan non TB menjadi *M tuberculosis* dan *Mycobacterium* lain hanya berdasarkan morfologi koloni, kecepatan tumbuh, dan jenis pigmen yang terbentuk perlu dilanjutkan pada penentuan *cord factor*, uji PNB dan uji Niasin serta uji-uji lain.
2. Berdasarkan hasil penelitian dianjurkan agar menggunakan media LJ sebagai media untuk konfirmasi hasil pemeriksaan mikroskopis.
3. Hasil kultur dapat juga digunakan untuk perbandingan menggunakan metode PCR, resistensi OAT dengan menggunakan kultur media, baik media cair maupun media padat.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ang F, RMT, Myrna T. Mendoza, MD, Heidi R. Santos, Regina Celada-Ong, Carmela P. Enrile, Wilma C. Bulatao and Aileen M. Aguila. 2011. *Isolation Rates of Mycobacterium tuberculosis from Smear-negative and Smear-positive Sputum Specimen Using the Ogawa Culture Technique and the Standard Lowenstein Jensen Culture Technique*. <http://www.psmid.org.ph/vol30/vol30num2topic1.pdf>
- Anonim. 2011. *Tuberculosis Diagnosis*. Wikipedia-the free encyclopedia. Dikutip dari: [http://en.wikipedia.org/wiki/Tuberculosis\\_diagnosis](http://en.wikipedia.org/wiki/Tuberculosis_diagnosis), tanggal 1 Mei 2011. 4:43 PM.
- Asa ad Maidin M, 2005. Harapan dan Tantangan Aplikasi Reaksi Rantai Polymerase (PCR) Multipleks dalam Pemberantasan TB Paru di Indonesia (Suatu Pendekatan Biologi Molekuler). Supplement. Vol 26.
- CDC. 2010. *TB Elimination-Diagnosis of Tuberculosis Disease*. Dikutip dari: [www.cdc.gov/tb](http://www.cdc.gov/tb), April 2010.
- Depkes RI, 2006. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*, Edisi 2, cetakan pertama
- Depkes RI, 2007. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*, Edisi 2, cetakan pertama
- Dikes Lotim, 2010. *Profil Bidang P2PL tahun 2010*.
- Good Laboratory Practice*. 1999. Pusat Laboratorium Kesehatan. Depkes RI. <http://www.scribd.com/doc/9428282/Cara-pengambilan-penyimpanan-dan-pengiriman-spesimen-klinik>
- Kalma. Deteksi Antibody Spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dalam Serum Penderita Tuberculosis Paru Menggunakan AIM TB Rapid Card. JBP Vol. 5, No 1, Januari 2003.

- Misnadiarly. *Pemeriksaan Laboratorium-Tuberkulosis dan Mikobakterium Atipik-Identitas Lengkap Mikobakteria dengan Atlas Berwarna*. Dian Rakyat.
- PDPI, 2006. *Tuberkulosis-Pedoman Diagnosis & Penatalaksanaan di Indonesia*. Dikutip dari <http://www.klikpdpi.com>.4/24/2011 4:15 PM
- Prabu, 2008. *Diagnosis Tuberculosis/TBC*. Dikutip dari : <http://putraprabu.wordpress.com/2008/12/23/diagnosis-tuberculosis-tbc/>
- Retno. 2001. *Diagnosis Serologik pada Tuberkulosis Paru*. Dikutip dari: <http://members.fortunecity.com> 4/24/2011 3:23 PM.
- Riskesdas, 2010. *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan R.I. Jakarta 2010*.
- Sjahrurachman Agus. 2008. *Modul- Kultur dan Uji Kepekaan M tuberculosis terhadap Obat Anti Tuberculosis Lini Pertama*. Departemen Kesehatan RI.
- Tanoue S, S Mitaraif, H Shishido, 2002. *Comparative Study on the Use of Solid Media. Lowenstein-Jensen and Ogawa in the Determination of Antituberculosis Drug Susceptibility*. Volume 82, Issue 2, Page 63-67 (June 2002). Elsevier Science Ltd. Abstract.
- Walt van der Martie, Rustomjee Roxanna, Mizrahi Valerie, Helden Paul van. 2011. *Tuberculosis Part III: Culture Media*. SA Health Info.Last up date: 22 June-2011.
- WHO.2010.*Treatment of Tuberculosis Guidelines*
- Wikipedia, 28 April 2011 at 23:42. *Tuberculosis, from World Health Organization (WHO) WHO report 2008: Global tuberculosis control* Retrieved on 13 April 2009.)