

Studi Komparasi Media Kultur Coco Blood Malachite Green (CBM) dengan Lowenstein Jensen (LJ) untuk Diagnosis Cepat, Spesifik, dan Sensitif pada Sputum Pasien Suspek Tuberkulosis

Anisful Lailil Munawaroh*, Dwi Yuni Nur Hidayati**, Yulian Wiji Utami*

ABSTRAK

Di Indonesia, TB merupakan permasalahan kesehatan utama, bahkan masuk ke dalam 10 negara dengan beban TB terbanyak di dunia. Diagnosis laboratorium penyakit TB masih menjadi permasalahan yang penting di Indonesia. Media biakan yang menjadi *gold standard* untuk menegakkan diagnosis TB adalah media lowenstein-jensen (LJ). Akan tetapi, metode ini memerlukan inkubasi yang lama yaitu sekitar 8 minggu setelah waktu inokulasi. Untuk meminimalkan risiko penularan lebih luas dan perjalanan penyakit yang lebih berat, diagnostik TB memerlukan medium biakan yang lebih cepat. *Coco blood malachite green* (CBM) merupakan inovasi media kultur yang memiliki komposisi air kelapa muda, *malachite green*, darah domba, agar darah, dan gliserol. Air kelapa merupakan cairan yang kaya nutrisi dan steril, *malachite green* memiliki sifat bakteriostatik, hal ini memiliki efek positif dalam mencegah adanya kontaminasi dalam media kultur CBM. Agar darah mengandung protein, lemak, karbohidrat serta elemen nutrisi penting yang dapat mempercepat pertumbuhan dari beberapa jenis bakteri termasuk *Mycobacterium*. Darah domba mengandung protein hematin sebagai sumber nutrisi bakteri. Gliserol sebagai sumber karbon. Penelitian ini merupakan eksperimental murni *post test only control group design* dengan 31 sampel sputum penderita suspek tuberkulosis yang di inokulasi pada 31 media CBM dan 31 media LJ sebagai kontrol positif. Pengamatan makroskopis dilakukan maksimal 8 minggu, pertumbuhan koloni dikonfirmasi dengan pengecatan BTA. Hasil uji Mann Whitney didapatkan nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Nilai spesifitas 96,6 % dan sensitivitas 100 %. Dapat disimpulkan bahwa CBM lebih cepat dan sensitif daripada LJ, namun LJ lebih spesifik daripada CBM.

Kata kunci : Media kultur, *Mycobacterium tuberculosis*, Sputum suspek TB.

Comparative Study of Coco Blood Malachite Green Culture Media with Lowenstein Jensen (LJ) for Rapid Diagnostic, Specific, and Sensitive on Sputum of Tuberculosis Suspect Patient

ABSTRACT

In Indonesia, TB remains as one of the major health problems, even belonging to the most 10 countries with the highest TB burden in the world. Laboratory diagnosis of tuberculosis remains an important problem. Culture medium which is gold standard to diagnose TB is lowenstein jensen media (LJ). However, this method requires long time incubation that is approximately 8 weeks. To minimize the spreading risk and the worse prognosis, TB diagnostic requires a faster culture media. Coco blood malachite green (CBM) is an innovative modification media for culturing TB bacteria which consists of coconut water, malachite green, blood sheep, blood agar and glycerol. Coconut water is sterile liquid that rich of nutrition. Malachite green plays as bacteriostatic to prevent contamination. Blood agar contains protein, fat, carbohydrates and essential nutritional elements which can accelerate the growth of several types of bacteria including *Mycobacterium*. Blood sheep consist of hematin protein as nutritional source for bacteria. Glycerol as source of carbon. This research was pure experimental post test only control group design with 31 sputum samples from tuberculosis suspect patient which inoculated in 31 CBM and 31 LJ as a positive control. Macroscopic observation was done maximum in 8 weeks. Bacteria growth was confirmed with Ziehl-Neelsen staining. Mann Whitney value was 0,000 ($p < 0,05$), specificity value was 96,6 % and sensitivity was 100 %. To conclude, CBM media was faster and more sensitive than LJ, but LJ more specific than CBM media.

Keywords : Culture media, *Mycobacterium tuberculosis*, Sputum suspect TB.

* Program Studi Ilmu Keperawatan, FKUB

** Laboratorium Mikrobiologi, FKUB

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.¹ Hingga saat ini TB masih menjadi masalah kesehatan dunia yang belum dapat terselesaikan. Bahkan, WHO memperkirakan antara tahun 2002 sampai 2020 secara total sepertiga populasi di dunia pernah terinfeksi TB dan 8,7 juta merupakan kasus baru (penderita TB aktif) dan tiap tahunnya 1,7 juta meninggal karena TB.² Indonesia memiliki prevalensi TB tinggi dan masih menjadi permasalahan kesehatan utama. Indonesia termasuk dalam 10 negara dengan beban TB terbanyak di dunia.

Seperti dilaporkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) dalam Global Report tahun 2011 menyatakan bahwa Indonesia memiliki total kasus tuberkulosis baru sebanyak 450 ribu per tahun dan prevalensi sekitar 690 ribu per tahun.³ Pada tahun 2010 Indonesia mempunyai angka insiden TB sebanyak 450.000 kasus atau 189 kasus per 100.000 penduduk, angka prevalensi TB sebanyak 690.000 kasus atau 289 kasus per 100.000 penduduk. Sedangkan angka kematian karena kasus TB sebesar 64.000 atau 27 kematian per 100.000.⁴

Angka penjarangan suspek terhadap TB di Indonesia dari tahun 2007 hingga 2011 cenderung mengalami peningkatan. Peningkatan berarti terjadi pada tahun 2010 dan 2011, dari 687 suspek per 100.000 penduduk pada tahun 2009 menjadi 744 suspek per 100 penduduk pada tahun 2010 dan pada tahun 2011 angka penjarangan suspek menjadi 807 per 100.000 penduduk. Angka proporsi persentase pasien baru dengan BTA positif yang ditemukan pada suspek yang diperiksa dahaknya, di Indonesia sekitar 5 % hingga 15 %.³ Di Kabupaten Malang berbagai upaya pengendalian TB sudah dilakukan namun masih jauh dari sempurna. Terutama yang

masih menjadi kendala adalah pada saat penemuan penderita. Angka penemuan penderita TB paru dengan bakteri tahan asam positif di Kabupaten Malang mengalami peningkatan dari 36,42 % pada tahun 2010 44,4 % pada tahun 2011, namun masih dibawah target nasional. Pada tahun 2012 sampai September 2012 ditemukan penderita TB paru positif sebanyak 827 orang sedangkan target penderita dengan BTA positif yang harus ditemukan sebanyak 2627 orang.⁵

Sifat *Mycobacterium tuberculosis* yang lambat pada waktu pembelahan sekitar 20 jam, sehingga di kultur pertumbuhan baru tampak setelah 4 sampai dengan 8 minggu. Untuk dapat tumbuh di media kultur diperlukan 50 sampai 100 bakteri/ml sputum.⁶ Media perbenihan bertujuan untuk memperbanyak bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam spesimen sputum, sehingga dapat meningkatkan deteksi tuberkulosis. Sekarang ini banyak media yang dapat digunakan sebagai kultur dari *Mycobacterium tuberculosis* seperti lowenstein-jensen, *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT). Tetapi semua pemeriksaan di atas memakan biaya yang tidak murah. Dengan demikian masih berkembang teknik lain dalam penelitian kultur guna mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* guna mendapatkan metode kultur yang murah dan tingkat sensitifitas dan spesitifitasnya tinggi.⁷

Kultur *Mycobacterium tuberculosis* dari dahak penderita merupakan *gold standard* untuk penegakan diagnosa TB saat ini. Media yang umum digunakan adalah media *lowenstein jensen* (LJ) yaitu media berbasis telur yang digabungkan dengan penggunaan elektrolit dan *malachite green* direkomendasikan sebagai isolasi, kultur dan studi kerentanan terhadap obat.⁸ Koloni makroskopis *Mycobacterium tuberculosis* pada media LJ timbul antara minggu ke 2 sampai minggu ke 6 dan hasil kultur negatif

baru bisa dinyatakan setelah 8 minggu waktu kultur.⁹ Pada kasus kronik atau gagal pengobatan maka dilakukan pemeriksaan kultur atau biakan yang merupakan pemeriksaan baku emas dan berperan pada pemeriksaan uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT).⁹

Pada penelitian sebelumnya modifikasi media kultur *coco blood malachite green* (CBM) memiliki komposisi bahan dasar *coconut* atau air kelapa muda, darah domba, agar darah (*blood agar*), dan *malachite green*. Keunggulan penelitian *coco blood malachite green* (CBM) antara lain komposisi yang sederhana dapat diaplikasikan pada laboratorium dengan fasilitas yang terbatas, berhasil menumbuhkan kuman kontrol standar WHO yaitu H37RV yang menunjukkan bahwa media *coco blood malachite green* (CBM) termasuk bagus dan berpotensi untuk menjadi alternatif media kultur. Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* lebih cepat dibandingkan LJ dan bermakna secara statistik ($p < 0,001$). Kekurangan pada penelitian *coco blood malachite green* (CBM) terletak pada tingkat sensitivitas dan spesifikasi yang hasilnya tidak valid. Hal ini dikarenakan jumlah sampel yang sedikit. Selain itu, koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang dilihat dengan pewarnaan Ziehl Neelsen diketahui struktur bakteri lebih kurus dibandingkan dengan yang tumbuh di media LJ, hal ini diduga bakteri kekurangan nutrisi. Sampel yang digunakan adalah bakteri hasil subkultur, sehingga pada penelitian lanjutan akan dilakukan modifikasi sampel yaitu menggunakan sampel sputum dan pada komposisi media ditambahkan gliserol.

Perawat memiliki berbagai peran seperti pemberi perawatan, pengambil keputusan klinik, advokat, peneliti, dan pendidik.¹⁰ Perawat memiliki peran juga dalam respon biologis manusia, sehingga permasalahan biologis manusia juga dapat diteliti oleh

perawat, seperti halnya permasalahan tuberkulosis dan diagnosis yang masih menjadi permasalahan di negara berkembang. Melihat pemeriksaan diagnosis yang mahal tersebut maka perawat peneliti memiliki peran untuk menemukan inovasi dan alternatif bagi pasien, sehingga perawat juga berperan sebagai advokat untuk memberikan pilihan diagnosis yang efektif bagi pasien.

Oleh karena itu, dengan adanya penelitian lanjutan modifikasi media kultur bakteri *coco blood malachite green* (CBM) diharapkan menjadi salah satu inovasi yang dapat diinformasikan kepada interprofesional tim medis untuk dapat dijadikan kolaborasi dalam strategi sarana diagnostik tuberkulosis yang cepat, spesifik dan sensitif, sehingga dapat bermanfaat untuk masyarakat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kecepatan pertumbuhan koloni, tingkat spesifisitas dan sensitivitas antara media LJ dan CBM pada sputum pasien suspek tuberkulosis.

Manfaat teoritis penelitian ini adalah dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya tentang media kultur untuk pertumbuhan bakteri *Mycobacterium*. Sementara manfaat praktis penelitian ini adalah dapat dijadikan sebagai alternatif media kultur bakteri *Mycobacterium* yang lebih cepat, spesifik, dan sensitif yang mudah diaplikasikan pada masyarakat, dapat diinformasikan dan diaplikasikan interprofesional tim medis untuk kolaborasi *screening* tuberkulosis, dan dijadikan alternatif bagi pasien.

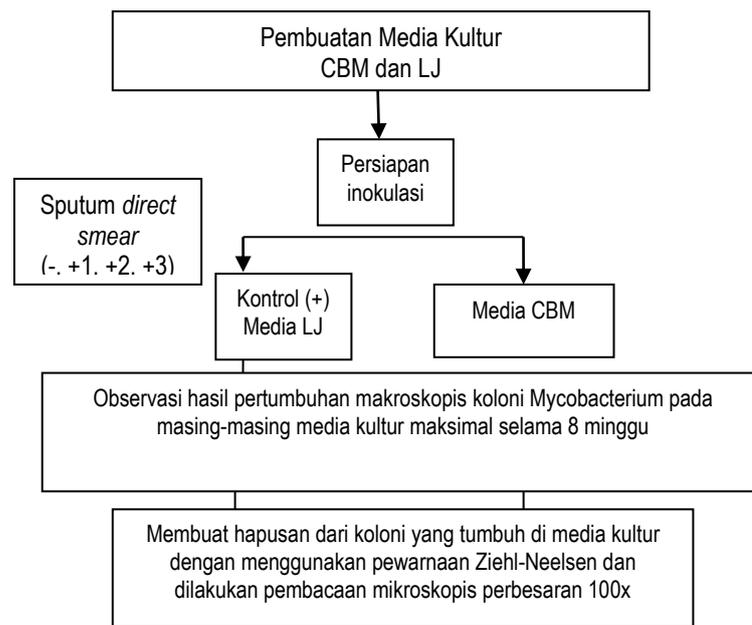
BAHAN DAN METODE

Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *true experiment post test only control group design* dengan melakukan uji diagnostik media kultur *coco blood malachite green* (CBM) dibandingkan dengan media *lowenstein jensen* (LJ) sebagai *gold standar*. Dalam rancangan ini dilakukan randomisasi,

artinya pengelompokan kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan berdasarkan acak atau random. Jumlah sampel sputum pasien suspek tuberkulosis yang sudah melakukan *informed consent* adalah 31. Sputum suspek tuberkulosis di tanam pada 31 media CBM dan 31 media LJ.

Alur Kerja Penelitian



Proses Pembuatan CBM

- Masukkan 4 g serbuk agar darah dan 1,25 ml gliserol ke dalam 20 ml air distilasi dan ratakan. Setelah rata tuangkan 0,4 g *malachite green* ke dalam campuran agar darah dan gliserol.
- Sterilisasi campuran tersebut dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- Agar yang telah disterilisasi dibiarkan dingin hingga mencapai suhu 50 °C.
- Air kelapa yang digunakan adalah kelapa jenis *Cocos nucifera* yang di petik maksimal 48 jam dari pohon. Kelapa muda dilubangi secara aseptis menggunakan spuit filter dan air kelapa dikumpulkan ke dalam *conical flasks* steril dengan tetap menjaga sterilitas dari air kelapa muda.
- Sebagian kecil air kelapa diambil untuk lakukan pengukuran pH.
- 80 ml air kelapa muda dimasukkan menggunakan teknik aseptik ke dalam *conical flask* steril.
- Tetap menjaga sterilitas, air kelapa muda tadi ditambahkan kedalam agar dengan tetap mengaduk perlahan agar secara terus menerus. Sehingga didapatkan *coconut nutrient agar*.
- Siapkan darah yang diambil dari vena jugularis domba sebanyak 25 ml dan dicampurkan dengan 5 ml sodium sitrat (3,8 %).
- 7 ml dari campuran darah domba dan sodium citrate kemudian dimasukkan ke dalam *coconut nutrient agar*.

10. Campuran ini lalu diaduk hingga rata dan 6-8 ml campuran ini dimasukkan ke dalam botol anulir.
11. Diamkan hingga media siap digunakan.
12. Media yang sudah siap harus di inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam untuk uji sterilisasi. Media yang menunjukkan pertumbuhan koloni apapun harus dibuang.
13. Setelah uji sterilisasi, media kultur *CBM (Coconut Blood Malachite)* dapat langsung digunakan untuk inokulasi *Mycobacterium tuberculosis* atau disimpan pada suhu 2-8 °C

Dekontaminasi Sputum

1. Tuang contoh uji ke dalam tabung sentrifus 50 ml
2. Ditambahkan NaOH
3. Kocok sampai homogen, tidak lebih dari 30 detik dan diamkan selama 15 menit pada suhu kamar.
4. Tambah PBS sampai volume 45 ml. Bolak-balik tabung beberapa kali
5. Timbang agar posisi pada waktu sentrifus seimbang.
6. *Centrifuge* selama 20 menit, 4°C
7. Buang *supernatant* kemudian ditambah 1 ml PBS
8. Inokulasi pada media sebanyak 100 µl (4 tetes pipet plastik vol 1 ml)
9. Inkubasi pada suhu 37°C

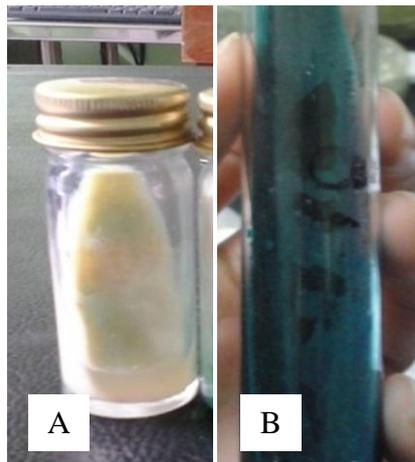
Pewarnaan Ziehl-Neelsen

1. Ambil objek glass

2. Beri etiket dan lingkari objek glass dengan spidol permanen kira - kira 1 - 2 cm dibelakang objek glass
3. Oleskan koloni diatas objek glass dan keringkan pada suhu kamar
4. Fiksasi diatas api selama 3 kali
5. Teteskan karbol fukhsin kuat pada sediaan sambil diuapkan selama 5 menit. Lalu bilas menggunakan air mengalir.
6. Kemudian teteskan alkohol asam pada sediaan. Lalu tunggu selama 30 detik kemudian bilas dengan air mengalir.
7. Setelah itu teteskan methyien blue pada sediaan dan biarkan selama 2 menit lalu bilas menggunakan air mengalir.
8. Tunggu sampai kering dan periksa dibawah mikroskop dengan menggunakan imersi dan pembesaran 100 x.

HASIL

Hasil kecepatan pertumbuhan didapatkan dari pengamatan secara makroskopis koloni yang tumbuh pada masing-masing media. Perbedaan karakteristik koloni dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

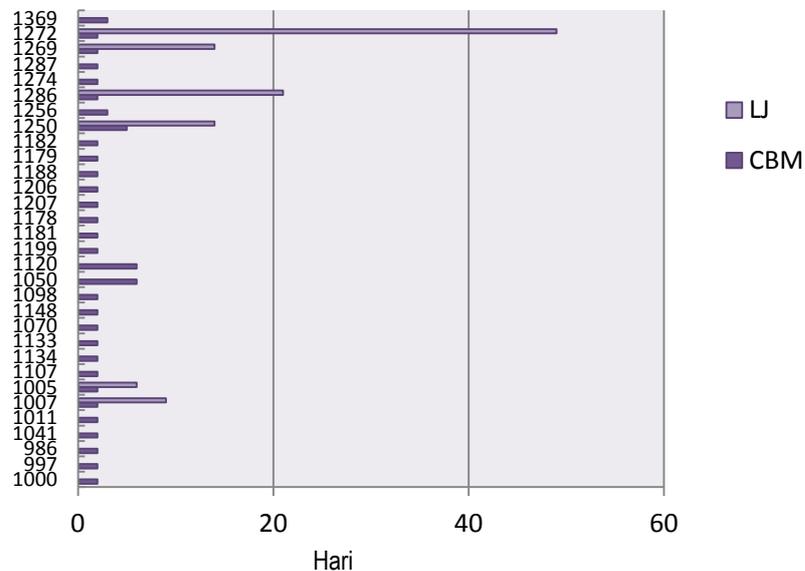


Gambar 1. Morfologi koloni TB pada media CBM dan LJ. Keterangan: **A.** Karakteristik koloni yang tumbuh pada media CBM adalah berwarna putih, tampak tipis dan menyebar; **B.** Karakteristik koloni pada media LJ adalah berwarna kekuningan seperti bunga kol.

Kecepatan Pertumbuhan Koloni

Dari hasil pengamatan makroskopis maka dilakukan perbandingan kecepatan pertumbuhan antara media LJ dan media CBM selama maksimal 8 minggu

pengamatan pada 31 sampel. Jika koloni tidak tumbuh dalam pengamatan selama 8 minggu, dapat disimpulkan hasil pelaporan pengamatan mikroskopis adalah BTA negative.⁹



Gambar 2. Perbandingan kecepatan pertumbuhan koloni TB pada media CBM dan media LJ

Pada media CBM 100 % terdapat pertumbuhan koloni, jumlah durasi kultur tercepat adalah 2 hari dan terlama adalah 6 hari, sedangkan koloni yang tumbuh pada media LJ sebesar 22,5 %, jumlah durasi kultur tercepat adalah 6 hari dari sampel kode

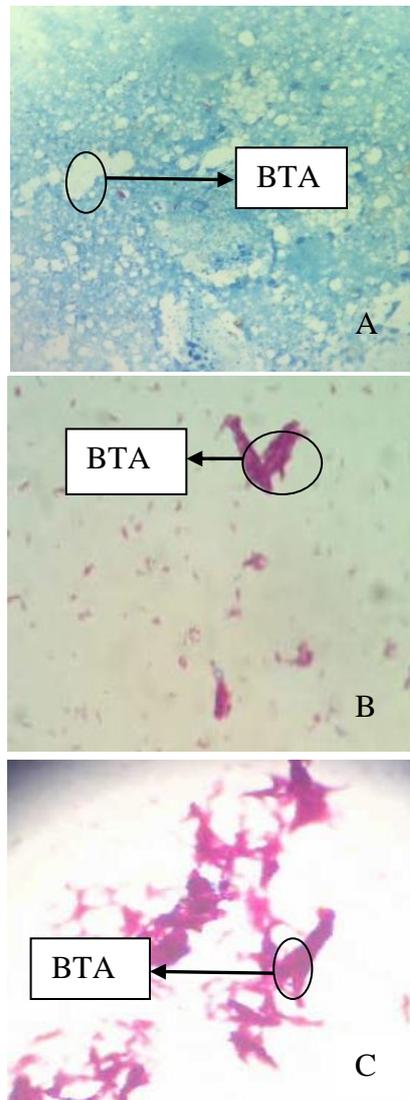
1005 dan terlama adalah 49 hari dari sampel kode 1272.

Tingkat Spesifisitas dan Sensitivitas

Dari hasil pengamatan 31 media kultur CBM yang terdapat pertumbuhan didapatkan hasil kode 1005 dan 1007 terdapat BTA

positif dan 29 media CBM lainnya BTA negatif. Pada media LJ hanya media kode 1005, 1007, 1050, 1269, 1286, 1272 menunjukkan pertumbuhan koloni, namun dari hasil pengamatan mikroskopis hanya kode 1007 yang menunjukkan hasil BTA

positif. Media LJ selain kode tersebut tidak terjadi pertumbuhan koloni, sampa dengan batas maksimal 8 minggu, sehingga dapat disimpulkan pada hasil pelaporan pengamatan ditulis BTA negatif.



Gambar 3. Morfologi sel bakteri TB yang merupakan bakteri tahan asam dengan pengecatan Ziehl-Neelsen. Keterangan: **A.** Bakteri tahan asam yang dikultur pada media CBM kode 1005; **B.** Bakteri tahan asam yang dikultur pada media CBM kode 1007; **C.** Bakteri tahan asam yang dikultur pada media LJ kode 1007.

Setelah hasil pembacaan mikroskopis, maka dilakukan uji 2x2 untuk mengetahui nilai sensitifitas dan spesifisitas.

Analisis Data

Data-data yang didapatkan dari dianalisis dengan software SPSS 21 *for windows*. Metode analisis menggunakan uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($p >$

0,05). untuk melihat perbedaan kecepatan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada media CBM dengan media LJ menggunakan uji *independent t-test*. Apabila distribusi data tidak normal

menggunakan Mann Whitney *test* ($p < 0,05$). Analisis spesifisitas dan sensitivitas dilakukan dengan menggunakan tabel uji diagnostik yang disajikan dalam tabel 2x2.

Tabel 1. Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov

Hasil Uji Media LJ				
Hasil Uji Media CBM	Positif	Positif	Negatif	Total
	a = 1	b = 1		2
	c = 0	d = 29		29
Total	1	30		31

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	d	Sig.
Kecepatan Pertumbuhan LJ	.485	31	.000	.425	3	.000
Kecepatan Pertumbuhan CBM	.437	31	.000	.497	3	.000

Hasil uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, didapatkan angka signifikansi $p < 0,05$ yaitu 0.00 untuk kecepatan pertumbuhan koloni.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi tidak normal. Maka langkah selanjutnya tidak dapat melakukan uji *parametric t-test independent*, namun dilakukan uji non parametrik Mann Whitney.

Tabel 2. Hasil uji Mann Whitney

Test Statistics	
	Kecepatan Pertumbuhan
Mann-Whitney U	216.000
Wilcoxon W	712.000
Z	-3.996
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

Dari hasil uji perbedaan kecepatan pertumbuhan koloni pada kedua kelompok didapatkan nilai p sebesar 0,000. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa media CBM memiliki pertumbuhan koloni lebih cepat dibandingkan media LJ.

Uji 2x2 digunakan untuk mengetahui tingkat spesifisitas dan sensitivitas media CBM dibandingkan dengan media LJ. Berikut hasil perhitungan uji 2x2 :

- Uji 2x2

- a. Spesifisitas

$$\frac{d}{b+d} \times 100\% = \frac{29}{29+1} \times 100\% = 96,6 \%$$

- b. Sensitivitas

$$\frac{a}{a+c} \times 100\% = \frac{1}{1+0} \times 100\% = 100 \%$$

Dari hasil perhitungan komparasi spesifisitas dan sensitivitas media CBM dibandingkan LJ didapatkan nilai spesifisitas 96,6 % dan sensitivitas 100 %.

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya yaitu hanya menggunakan sampel sub kultur dan *M. tuberculosis* H37RV. Didapatkan data hasil pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada media CBM lebih cepat dibandingkan LJ dan bermakna secara statistik ($p < 0,001$).

Seperti yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya perbedaan dengan bakteri lainnya yaitu *M. tuberculosis* resisten terhadap agen antibakterial seperti penisilin dan mampu bertahan dalam kondisi kekeringan dalam waktu yang lama.¹¹ Sifat *M. tuberculosis* yang lambat pada waktu pembelahan sekitar 20 jam, sehingga pada media kultur, pertumbuhan baru tampak setelah 4 sampai dengan 8 minggu. Untuk

dapat tumbuh di media kultur diperlukan 50 sampai 100 bakteri/ml sputum.⁶ Pada penelitian ini dilakukan pengamatan makroskopis kecepatan pertumbuhan koloni dan pengamatan mikroskopis BTA untuk konfirmasi koloni yang tumbuh untuk mengetahui nilai spesifisitas dan sensitivitas antara media LJ dan CBM.

Kecepatan Pertumbuhan Koloni

Kecepatan pertumbuhan pada penelitian ini dilihat dari hasil jumlah hari yang dibutuhkan media LJ dan CBM untuk menumbuhkan koloni. Media LJ dijadikan acuan untuk mengetahui perbedaan kecepatan pertumbuhan koloni karena LJ merupakan media *gold standard* untuk diagnosis tuberkulosis.

Dari hasil pengamatan secara makroskopis didapatkan data pertumbuhan pada media LJ pertumbuhan tercepat yaitu 6 hari dan waktu terlama adalah 49 hari. Pada media CB pertumbuhan tercepat yaitu 2 hari dan waktu terlama adalah 6 hari. Berdasarkan data uji Mann Whitney terdapat perbedaan kecepatan pertumbuhan yang signifikan dan dapat disimpulkan media CBM memiliki pertumbuhan koloni yang lebih cepat dibandingkan media LJ.

Hal ini disebabkan oleh komposisi modifikasi media kultur CBM yang terdiri dari air kelapa muda, agar darah, darah domba, malachite green, dan gliserol yang kaya nutrisi untuk mempercepat pertumbuhan koloni. Air kelapa merupakan cairan yang steril, mengandung protein, lemak dan kaya akan karbohidrat. Selain itu, air kelapa juga mengandung banyak elemen nutrisi penting.¹² Penelitian oleh Sevilla *et al* (2001) juga berhasil mengisolasi *M. tuberculosis* pada media *coconut water egg malachite green media*.¹³

Berdasarkan penelitian Mathur (2009) yang membandingkan antara media lowenstein jensen dengan agar darah

didapatkan hasil deteksi koloni *M. tuberculosis* makroskopik lebih cepat ($13,6 \pm 5,2$ hari) pada media agar darah dibandingkan media LJ ($20,4 \pm 5,1$ hari).¹⁴ Darah domba memiliki nutrisi berupa protein hematin yang berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi bakteri.¹⁵ Jadi darah domba berpotensi sebagai pengganti telur bebek. Syarat penggunaan telur ayam/bebek pada poses pembuatan media LJ harus segar yang berumur tidak lebih 7 hari dan pakan ternak tidak boleh yang memakai antibiotik.¹⁶

Malachite green memiliki sifat bakteriostatik terhadap bakteri lain, dapat diinkorporasikan ke dalam media tanpa menghambat pertumbuhan basil tuberkel. Basil tuberkel masih dapat hidup dalam asam dan alkali sehingga dapat membantu mengeliminasi/menghilangkan organisme terkontaminasi sekaligus meningkatkan pertumbuhan dini dari *Mycobacteria*.¹³ Penambahan gliserol bertujuan untuk dijadikan sumber karbon dan energi untuk metabolisme dan mempercepat pertumbuhan *M. tuberculosis*.¹⁷ Jadi pada penelitian ini terdapat 31 sampel yang menumbuhkan koloni lebih cepat secara makroskopis.

Selain itu, keunggulan dari media CBM ini adalah risiko kontaminasi media lebih kecil dibandingkan media LJ. Hal ini dibuktikan dari hasil uji sterilitas media LJ lebih banyak terjadi kontaminasi, sedangkan pada media CBM tidak terjadi kontaminasi. Setelah dilakukan inokulasi dari 36 sampel didapatkan 5 sampel yang ditanam di media LJ terjadi kontaminasi. Berdasarkan studi literatur diketahui bahwa air kelapa ini merupakan cairan kaya nutrisi yang steril dan ditambahkan *malachite green* yang berfungsi sebagai bakteriostatik tanpa menghambat pertumbuhan basil tuberkel, sehingga berpotensi mencegah terjadinya kontaminasi.

Dari hasil data kecepatan pertumbuhan yang diamati selama 8 minggu hanya 7 sampel yang tumbuh pada media LJ. Koloni makroskopis *M. tuberculosis* pada media LJ

timbul antara minggu ke-2 sampai minggu ke-6 dan hasil kultur negatif baru bisa dinyatakan setelah 8 minggu waktu kultur.⁹ Dari hasil penelitian didapatkan sampel 1005 tumbuh tercepat pada media LJ yaitu dalam waktu 6 hari. Berdasarkan alur petunjuk teknis pemeriksaan biakan, identifikasi, dan uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* pada media padat.¹⁶ Jika koloni pada media LJ tumbuh kurang dari 7 hari diduga *Mycobacterium* sp. selain *M. tuberculosis*. Berdasarkan alur kerja di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RS Saiful Anwar jika terdapat pertumbuhan koloni harus dilakukan pembacaan secara mikroskopis.

Hasil pengamatan selama 8 minggu terdapat 24 media LJ yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni, hal ini dikarenakan positif pada salah satu, dua atau tiga pewarnaan tetapi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *M. tuberculosis* atau *Mycobacterium* sp. lain pada medium kemungkinan terjadi karena bakteri dalam sputum sudah mati atau pertumbuhan beberapa *Mycobacterium* sp. lain seperti *Mycobacterium bovis* dapat dihambat oleh kandungan gliserol dapat menjadi penyebab tidak tumbuhnya koloni.¹⁸ Pada penelitian ini kandungan dari media adalah gliserol, sehingga diduga jika bakteri tersebut adalah *Mycobacterium bovis* maka tidak terjadi pertumbuhan koloni.

Uji Diagnostik Tingkat Spesifisitas dan Sensitivitas

Uji diagnostik merupakan suatu uji penelitian yang bertujuan untuk menegakkan diagnosis atau menyingkirkan penyakit, *screening*, pengobatan pasien dan studi epidemiologi. Uji diagnostik baru harus memberi manfaat yang lebih dibanding uji yang sudah ada, meliputi beberapa hal yaitu:

- Nilai diagnostik tidak jauh berbeda dengan uji diagnostik standar
- Memberi kenyamanan bagi pasien (tidak invasif)

- Lebih mudah atau sederhana
- Lebih murah atau dapat mendiagnosis pada fase lebih dini

Sensitivitas adalah kemampuan suatu tes untuk mengidentifikasi atau mendiagnosa individu dengan tepat, hasil tes positif dan benar sakit. Semakin tinggi nilai sensitivitas sebuah tes maka semakin baik kemampuan mendeteksi seseorang menderita penyakit tertentu sehingga dapat memperoleh penanganan dini. Tujuan pengukuran sensitivitas untuk menghitung jumlah orang yang memang dinyatakan terkena penyakit dengan hasil tes positif. Spesifisitas adalah kemampuan suatu tes untuk mengidentifikasi atau mendiagnosa dengan tepat dengan hasil tes negatif dan benar tidak sakit. Semakin tinggi nilai spesifisitas sebuah tes *screening* maka semakin baik kemampuan mendeteksi seseorang tidak menderita penyakit tertentu.

Tujuan pengukuran spesifisitas untuk menghitung banyaknya orang yang tidak mengidap suatu penyakit dengan hasil tes negatif. Penilaian dari hasil uji sensitifitas dan spesifisitas untuk mengetahui dari beberapa kelemahan seperti, tidak semua hasil dari pemeriksaan dapat dinyatakan dengan tegas atau tidak terkenanya penyakit. Untuk mengatasi kelemahan ini dilakukan perhitungan nilai kecermatan dengan tujuan untuk menaksir banyaknya orang yang benar-benar menderita dari semua hasil tes yang positif.¹⁹ Untuk menguji nilai spesifisitas dan sensitivitas didapatkan dari hasil pengamatan mikroskopis dengan ditemukannya BTA pada koloni yang tumbuh pada media.

Sampel pada penelitian ini didapatkan 29 pasien tersangka penderita tuberkulosis dengan *direct smear* negatif dan 2 sampel dengan *direct smear* kode pasien 1005 adalah +2, kode pasien 1007 adalah +3. Dari hasil pengamatan mikroskopis 29 sampel dengan *direct smear* negatif dapat menumbuhkan koloni pada media CBM. Namun setelah dilakukan pembacaan

mikroskopis dari koloni yang tumbuh hasilnya adalah BTA negatif, sedangkan kode 1005 dan 1007 hasilnya adalah BTA positif.

Hasil pengamatan mikroskopis pada media LJ 7 koloni yang tumbuh yaitu kode 1005, 1007, 1269, 1272, 1286, dan 1250. Hanya pasien sampel kode 1005 yang sebelumnya *direct smear* +2 hasil mikroskopis dari koloni yang tumbuh adalah BTA negatif dan kode pasien 1007 memiliki *direct smear* +3 hasil pembacaan mikroskopis dari koloni yang tumbuh adalah BTA positif. Sementara pada media CBM pasien dengan kode 1005 didapatkan BTA positif dan BTA negatif pada media LJ, walaupun *direct smear* pada kode 1005 adalah +2. Pasien kode 1005 ini adalah tersangka penderita TB MDR dikarenakan manajemen terapi OAT yang tidak sesuai prosedur. Hal ini ditunjang oleh studi literatur hasil kultur yang negatif dikarenakan pada penderita yang mendapat terapi OAT, kuman *M. tuberculosis* dapat kehilangan kemampuan untuk tumbuh pada media kultur atau kuman telah mati.²⁰ Hasil kultur yang negatif juga diduga disebabkan oleh kurang tepatnya penanganan sampel dahak dan atau prosedur pembuatan kultur. Penanganan sampel dahak kurang tepat bila sampel dahak terpapar dengan sinar matahari atau temperatur yang tinggi, disimpan terlalu lama, mengering, atau terkontaminasi. Prosedur dekontaminasi yang berlebihan sebelum dilakukan inokulasi, pemanasan yang berlebihan selama sentrifugasi, media kultur yang tidak adekuat, dan kurangnya masa inkubasi merupakan beberapa keadaan yang dapat menyebabkan hasil kultur negative.²⁰

Selain kode pasien kode 1005, pasien dengan kode 1007 ditemukan BTA positif pada media LJ dan media CBM. Namun, perbedaan karakteristik saat dilakukan pengamatan pada mikroskop pembesaran 100x ditemukan BTA pada media LJ lebih subur, banyak ditemukan di setiap lapang pandang, dan morfologinya tidak tampak kurus dibandingkan pada media CBM.

Diduga dengan penambahan gliserol dapat memberikan nutrisi sehingga pada media CBM sehingga akan memberikan hasil mikroskopis yang lebih baik dibandingkan dengan media LJ. Hal ini diduga telur pada media LJ lebih memberikan nutrisi yang banyak pada bakteri dibandingkan protein hematin yang terdapat pada darah domba, sehingga untuk penelitian selanjutnya bisa digunakan alternatif lain selain darah domba.

Setelah mendapatkan data mikroskopis maka dilakukan uji 2x2 untuk mengetahui nilai sensitivitas dan spesifisitas dari media LJ dan CBM. Dari hasil uji 2x2 didapatkan hasil nilai spesifisitas 96,6 % dan sensitivitas 100 %. Berdasarkan Levinson (2008) media LJ memiliki sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 99 % dan 100%.²¹ Dari hasil perbandingan studi literatur dapat disimpulkan bahwa media CBM lebih sensitif daripada media LJ, namun media LJ lebih spesifik dibandingkan media CBM.

Keterbatasan Penelitian

Koloni yang dikonfirmasi dengan pewarnaan Ziehl Neelsen menghasilkan BTA positif belum tentu hasil tersebut adalah *Mycobacterium tuberculosis*. Pengamatan secara mikroskopis antara media LJ dan CBM masih lebih subur dan lebih banyak ditemukan BTA dari media LJ. Hal ini diduga protein media LJ yang berasal dari telur bebek lebih banyak menutrisi dibandingkan protein hematin yang berasal dari darah domba.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, maka dapat diambil kesimpulan bahwa Media *coco blood malachite green* (CBM) terbukti dapat menumbuhkan koloni lebih cepat, sehingga dapat menyingkat durasi kultur, lebih sensitif, namun kurang spesifik dibandingkan media Lowenstein Jensen (LJ).

SARAN

Mengingat masih banyaknya kelemahan dan keterbatasan yang penulis hadapi dalam melakukan penelitian ini, maka dari hasil penelitian ini dapat disarankan sebagai berikut :

1. Modifikasi komposisi media *coco blood malachite green* (CBM) dengan menggunakan alternatif sumber protein lain selain darah domba atau komposisi lainnya untuk menemukan komposisi yang lebih bernutrisi pada bakteri.
2. Dapat dilakukan tes niasin, DNA *probe* atau *sequencing* untuk konfirmasi pasti *Mycobacterium* yang tampak pada hasil pengamatan mikroskopis.
3. Pemilihan sampel yang lebih banyak dan kriteria yang lebih mendukung untuk membuktikan tuberkulosis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Price SA dan Lorraine MW. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta: EGC. 2006.
2. Notoatmodjo S. *Metode Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta. 2010.
3. Ditjen P2PL. Laporan Situasi Terkini Perkembangan Tuberkulosis di Indonesia Januari-Desember 2012. (Online). 2012. Diakses 19 September 2013. http://www.tbindonesia.or.id/pdf/2012/profil-tb_th2011.pdf.
4. [WHO] World Health Organization. New TB Cases 2011. (Online). 2011. Diakses 11 September 2013. <http://www.globalhealthfacts.org/data/topic/map.aspx?ind=12&gclid=CL2N5bW97LYCFcyF6wod5DcAPw>.
5. Malik A. Seminar Kesehatan sebagai Rangkaian Hari Kesehatan Nasional ke 48 dan Hari Jadi Kabupaten Malang ke 1252. (Online). 2012. Diakses 19

- September 2013.
<http://www.malangkab.go.id/?page=91&iid=1204>.
6. Frida E, Ibrahim dan Hardjoeno. Analysis of Acid Fast Bacilli (AFB) Findings and Concentrated Slides in Suspected Tuberculosis. *Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 2006. 12(2).
 7. Forbes BA *et al.* *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Edition. St Louis: Elsevier Mosby. 2007.
 8. Coban AY, Cihan CC, Bilgin K *et al.* Blood Agar for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Against First-Line Drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006.10:450–453.
 9. Jawetz, Melnick, Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. (H Hartanto, C Rachman, A Dimanti, A Diani). Jakarta: EGC. 2007.
 10. Potter PA, Perry GA. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan Konsep, Proses, dan Praktik*. Jakarta: EGC. 2002.
 11. PDPI. Tuberkulosis Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia. Jakarta: PDPI. 2006.
 12. Supadi dan Nurmanaf RA. Pemberdayaan Petani Kelapa dalam Upaya Peningkatan Pendapatan. *Litbang Pertanian*. 2006; 25(1).
 13. Sevilla VB. The Utilization of the Coconut Water Egg Malachite Green Media (CEM) for the Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Phil J Microbiol Infect Dis*. 2001;10(2):93–7).
 14. Mathur ML, Jyoti G, Ruchika S. Rapid Culture of *Mycobacterium tuberculosis* on Blood Agar in Resource Limited Setting. *Dan Med Bull*. 2009; (56):208-10.
 15. Drancourt M, Carrieri P, Gévaudan MJ *et al.* Blood Agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the End of a Dogma. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1710–1711.
 16. Kemenkes RI. Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan, Identifikasi, dan Uji Kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* pada Media Padat. Jakarta: Kemenkes. 2011.
 17. Kennedy AD. Biochemical Profile of *Mycobacterium tuberculosis* Grown Under Hypoxic Conditions (Snow Globe Model, SG7). 2011. (Online). Diakses 19 September 2013. www.metabolon.com.
 18. Karuniawati A, Risdiyani E, Nilawati S, Prawoto, Rosana Y, Alisyahbana B, Parwati I, Melia W, Sudiro TM. Comparison Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen and Fluorochrom Staining Method for Detect of Acid Fast Bacil in Sputum Samples. *Makara Kesehatan*. 2005. 9:29-33.
 19. Steven YK, Bogia IM, I Made S, Ketut ES. Perbandingan Sensitivitas dan Spesifisitas Uji Pewarnaan Sellers' dan *Fluorescent Antibody Technique* (FAT) dalam Mendiagnosa Penyakit Rabies pada Anjing di Bali. *Indonesia Medicus Veterinus* 2012; 1(1):12-21.
 20. Toman K. What is the Probability of Obtaining a Negative Culture from a Sputum Specimen Found Positive by Smear Microscopy?. In: Frieden T, Editor. *Toman's Tuberculosis Case detection, treatment, and monitoring – questions and answers*. 2nd Edition. Geneva: World Health Organization. 2004. p 44-45.
 21. Levinson W. *Review of Medical Microbiology and Immunology*. United States: The McGraw-Hill Companies Inc. 2008.