

PERBANDINGAN PERTUMBUHAN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* PADA MEDIA AGAR DARAH DOMBA DENGAN PREINKUBASI STHB (*SUPPLEMENTED TODD HEWITT BROTH*) DAN MEDIA AGAR DARAH DOMBA GENTAMISIN TANPA PREINKUBASI STHB

Hardina Yusri Chan¹, Helmia Farida²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Ilmu Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang Media agar darah domba gentamisin merupakan media selektif untuk kultur *Streptococcus pneumoniae* yang berasal dari spesimen swab nasofaring, namun kultur *S.pneumoniae* masih sulit dilakukan karena *S.pneumoniae* bersifat *fastidious* sehingga membutuhkan media dengan nutrisi yang khusus. Preinkubasi *S.pneumoniae* pada *Supplemented Todd Hewith Broth* (STHB) sebelum dilakukan kultur pada media agar darah domba dapat meningkatkan pertumbuhan *S.pneumoniae*.

Tujuan Menguji pertumbuhan *S.pneumoniae* dari spesimen swab nasofaring pada media agar darah domba dengan preinkubasi dalam STHB dibandingkan dengan media agar darah domba gentamisin.

Metode Desain penelitian *True experimental post test only*. Enambelas swab nasofaring ditanam langsung pada agar darah domba gentamisin dan di preinkubasi STHB 4-6 jam sebelum ditanam pada agar darah domba. Pengamatan pada 18, 24 dan 48 jam meliputi jumlah koloni, diameter koloni, diameter hemolisis, dan karakteristik koloni.

Hasil Jumlah koloni kedua media pada pengamatan 18 jam ($p=0,545$), 24 jam ($p=0,545$) dan 48 jam ($p=0,545$) memiliki perbedaan namun tidak bermakna. Pengamatan 18 jam terdapat perbedaan signifikan diameter koloni pada kedua media ($p=0,040$), namun perbedaan pada pengamatan 24 jam tidak bermakna ($p=0,073$) begitu juga pada 48 jam ($p=0,080$). Diameter zona hemolisis pada pengamatan 18 jam ($p=0,806$), 24 jam ($p=0,678$) dan 48 jam ($p=0,485$) memiliki perbedaan namun tidak bermakna. Karakteristik koloni pada pengamatan 18 jam ($p=0,654$), 24 jam ($p=0,479$) dan 48 jam ($p=0,433$) memiliki perbedaan namun tidak bermakna.

Kesimpulan Terdapat perbedaan pertumbuhan *S. pneumoniae* yang ditanam langsung pada agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB pada pengamatan 18, 24 dan 48 jam namun tidak bermakna.

Kata kunci: Agar darah domba, *S. pneumoniae*, STHB

ABSTRACT

COMPARISON THE GROWTH OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ON SHEEP BLOOD AGAR WITH PREINCUBATION IN SUPPLEMENTED TODD HEWITT BROTH (STHB) AND GENTAMISIN BLOOD AGAR WITHOUT PREINCUBATION IN STHB

Background Gentamicin blood agar is a selective medium for *Streptococcus pneumoniae* cultures derived from nasopharyngeal swab specimens, but cultures *S. pneumoniae* are still difficult because *S. pneumoniae* is fastidious and thus requires media with special nutrients.

Preincubation of *S. pneumoniae* in Supplemented Todd Hewith Broth (STHB) before culturing on sheep blood agar media can increase the growth of *S. pneumoniae*.

Aim To test the growth of *S. pneumoniae* from nasopharyngeal swab specimens on sheep blood agar media with preincubation in STHB compared with gentamicin blood agar media agar.

Methods This study used true experimental post test only. Sixteen nasopharyngeal swabs are cultured on gentamicin blood agar and preincubated STHB 4-6 hours before being cultered in sheep blood agar. Observations at 18, 24 and 48 hours included the number of colonies, colony diameter, diameter of hemolysis, and colony characteristics.

Results The number of colonies of both media on the 18 hours ($p = 0,545$), 24 hours ($p = 0,545$) and 48 hours ($p = 0,545$) were different but not significant. An observation of 18 hours there was a significant difference in colony diameter on both media ($p = 0.040$), but the difference in 24 hours was not significant ($p = 0.073$) as well as 48 hours ($p = 0.080$). The diameter of the hemolysis zone at 18 h ($p = 0.806$), 24 h ($p = 0.678$) and 48 h ($p = 0.485$) observations was different but not significant. Characteristics of colonies on the observation of 18 hours ($p = 0.654$), 24 hours ($p = 0.479$) and 48 hours ($p = 0.433$) had differences but not significant.

Conclusion There was difference in the growth of *S. pneumoniae* planted directly on gentamicin blood agar and sheep blood agar with STHB preincubation at 18, 24 and 48 hour but not significant.

Keywords: sheep blood agar, *S. pneumoniae*, STHB

PENDAHULUAN

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri diplokokus Gram positif, flora normal pada saluran pernapasan bagian atas manusia, terutama nasofaring.¹⁻⁵ *S.pneumoniae* dapat bersifat patogen bagi manusia. Kematian balita akibat infeksi *S.pneumoniae* diseluruh dunia diperkirakan mencapai 700.000 hingga 1 juta setiap tahunnya. Pada balita, *S.pneumoniae* merupakan penyebab utama kematian akibat pneumonia.^{6,7} Di Indonesia, pneumonia menjadi masalah kesehatan masyarakat utama dan menjadi penyakit penyebab kematian kedua tertinggi setelah diare (15,5 % diantara balita).⁸ Selain menyebabkan pneumonia,

bakteri ini juga dapat menyebabkan berbagai infeksi seperti sinusitis akut, otitis media akut, konjungtivitis, meningitis, osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis, peritonitis, selulitis dan abses otak.^{4,5}

Pengendalian penyakit akibat infeksi *S.pneumoniae* memerlukan tatalaksana diagnosis dan penanganan kasus yang tepat. *Gold standard* diagnosis penyakit akibat *S.pneumoniae* adalah dengan cara kultur.^{9,10} Kultur *S.pneumoniae* sulit dilakukan karena sifatnya yang *fastidious*. Untuk tumbuh *S.pneumoniae* memerlukan media yang kompleks, pada lingkungan dan nutrisi tertentu sehingga diperlukan media khusus untuk mengkultur bakteri

tersebut. Media khusus yang dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri ini adalah media agar darah. Media agar darah mengandung media pertumbuhan nutrisi khusus yang diperkaya dengan darah hewan atau manusia. Media tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan *S.pneumoniae*.

Laboratorium klinis diberbagai negara berkembang, termasuk Indonesia, biasa menggunakan agar darah manusia untuk pembuatan agar darah dikarenakan sulitnya memperoleh darah domba atau kuda.¹¹ Di negara-negara maju, media agar darah domba dan agar darah kuda menjadi media agar darah standar untuk menumbuhkan bakteri yang menggunakan media darah. Di Laboratorium Amerika Utara, darah domba defibrinasi dijadikan sebagai suplemen darah paling efisien untuk pembuatan media agar dan digunakan sebagai standar untuk mendefinisikan reaksi hemolitik. Di Eropa darah kuda sering digunakan untuk pembuatan media agar darah. Darah kuda banyak mengandung faktor V (piridin nukleotida) maka darah ini lebih baik untuk pertumbuhan *Haemophilus haemolyticus*, sedangkan untuk pertumbuhan kuman lainnya, seperti *Streptococcus sp.* lebih baik menggunakan darah domba, terutama untuk mengamati adanya hemolisis, sehingga darah kuda

direkomendasikan sebagai pilihan kedua.^{11,12}

Spesimen yang digunakan untuk kultur *S.pneumoniae* biasanya berasal dari sputum atau swab nasofaring.¹³ Swab nasofaring tidak hanya mengandung bakteri *S.pneumoniae*. Bakteri lain juga dapat ikut terambil dan ikut tumbuh pada media agar darah saat dilakukan kultur.¹⁴ Dalam suatu penelitian yang dilakukan oleh Farida *et al* pada balita di Semarang, Indonesia, karier *Klebsiella pneumoniae* sebesar 7% dan karier bakteri Gram negatif lain sebesar 20%. Jumlah bakteri lain yang melakukan kolonisasi bersama *S.pneumoniae* cukup banyak.¹⁴ Hal ini tentu dapat mengacaukan pemeriksaan kultur *S.pneumoniae*. Media agar darah domba dan gentamisin 5µg/ml dapat digunakan sebagai media selektif untuk pertumbuhan *S.pneumoniae*. Media ini mencegah pertumbuhan bakteri selain *S.pneumoniae* tanpa menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Oleh karena itu, beberapa peneliti menggunakan media agar darah gentamisin sebagai media kultur *S.pneumoniae*.¹³

Dalam suatu penelitian yang dilakukan oleh Carvalho *et al* ia mengemukakan bahwa preinkubasi pada *Supplemented Todd Hewith Broth* (STHB) sebelum dilakukan penanaman spesimen pada media agar darah domba dapat

meningkatkan jumlah spesimen yang terbukti positif mengandung *S.pneumoniae*. STHB mengandung *Todd Hewith Broth* (THB) yang ditambah dengan ekstrak *yeast* 0,5 % dan serum kelinci. Preinkubasi dalam STHB meningkatkan pertumbuhan strain minoritas hingga pada level yang dapat dideteksi melalui kultur pada agar darah.¹⁵ Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji pertumbuhan *S.pneumoniae* dari spesimen swab nasofaring pada media agar darah domba dengan preinkubasi dalam STHB dibandingkan dengan penanaman langsung pada media agar darah gentamisin.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain *True- experimental post test only*. Sampel penelitian ini adalah swab nasofaring dari balita sehat di Kelurahan Trimulyo Kecamatan Genuk, Kota Semarang yang disimpan dalam media *skim milk, tryptone, glucose and glycerin* (STGG) pada temperatur -80°C . Kriteria inklusi penelitian ini adalah swab nasofaring balita sehat yang disimpan dalam media STGG pada temperatur -80°C , yang telah disimpan selama satu tahun, sedangkan kriteria eksklusinya adalah terdapat kontaminasi atau kerusakan pada tube penyimpanan swab. Sampel diambil

dengan cara *Stratified Random sampling* dengan jumlah sampel 16 swab nasofaring yang didapatkan dari rumus *federer* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Pengambilan data dilakukan dengan cara menumbuhkan *S.pneumoniae* pada media yang telah ditentukan. Pada perlakuan pertama, 16 swab nasofaring di inkubasi pada *Suplemented Todd Hewitt Broth* (STHB) selama 4-6 jam, kemudian di streak pada media agar darah domba. Perlakuan kedua, keenambelas swab nasofaring langsung distreak pada media agar darah domba gentamisin. Bakteri *S.pneumoniae* ditanam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba kemudian diamati pola pertumbuhannya dalam 18 jam, 24 jam dan 48 jam. Variabel bebas penelitian ini adalah media agar darah domba dengan preinkubasi STHB dan media agar darah domba gentamisin, sedangkan variabel terikatnya ialah diameter koloni, diameter hemolisis, jumlah koloni, dan karakteristik koloni *S. pneumoniae*.

Analisa data menggunakan uji *Mann Whitney* untuk skala numerik (diameter koloni dan zona hemolisis) dan uji *Chi Square* untuk skala nominal dan ordinal (jumlah koloni dan karakteristik koloni).

HASIL

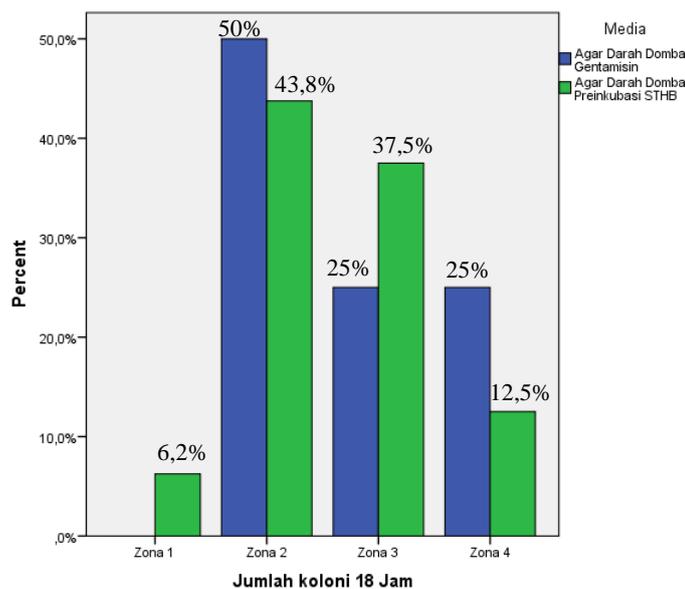
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Agustus 2017. Jumlah sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 16 swab nasofaring. Pengamatan jumlah koloni *S.pneumoniae* kedua media dilakukan pada 18 jam, 24 jam dan 48 jam. Jumlah koloni *S.pneumoniae* dinilai berdasarkan ada

tidaknya jumlah koloni pada setiap zona streak pada media agar. Jumlah koloni diberi nilai 1 bila terdapat koloni pada zona 1, nilai 2 bila terdapat koloni hingga zona 2, nilai 3 bila terdapat koloni hingga zona 3 dan nilai 4 bila terdapat koloni hingga zona 4. Hasil pengamatan jumlah koloni dijelaskan pada tabel dan grafik dibawah ini.

Tabel 1. Hasil pengamatan jumlah koloni pada 18 jam

Zona	Agar darah domba gentamisin		Agar darah domba preinkubasi STHB		Nilai <i>p</i>
	N	%	N	%	
1	0	0	1	6,2	0,545 [‡]
2	8	50	7	43,8	
3	4	25	6	37,5	
4	4	25	2	12,5	
Total	16	100	16	100	

Keterangan : [‡]Chi Square

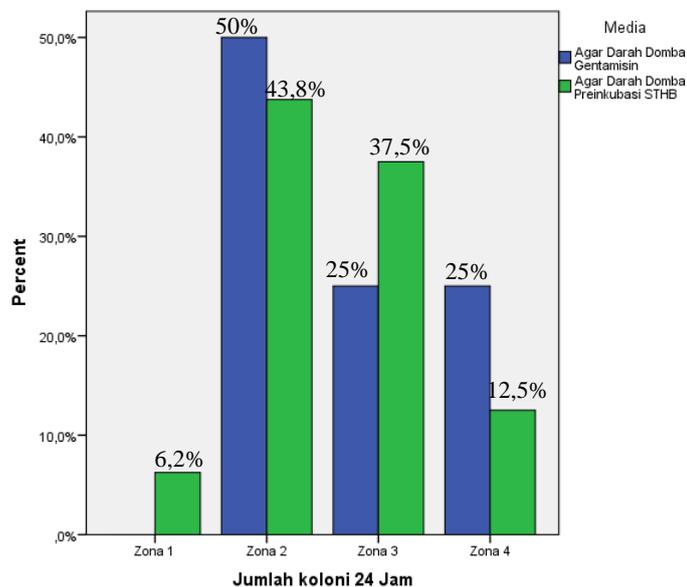


Grafik 1. Jumlah Koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 18 jam

Tabel 2 Hasil pengamatan jumlah koloni pada 24 jam

Zona	Agar darah domba gentamisin		Agar darah domba preinkubasi STHB		Nilai <i>p</i>
	N	%	N	%	
1	0	0	1	6,2	0,545 [‡]
2	8	50	7	43,8	
3	4	25	6	37,5	
4	4	25	2	12,5	
Total	16	100	16	100	

Keterangan : [‡]Chi Square

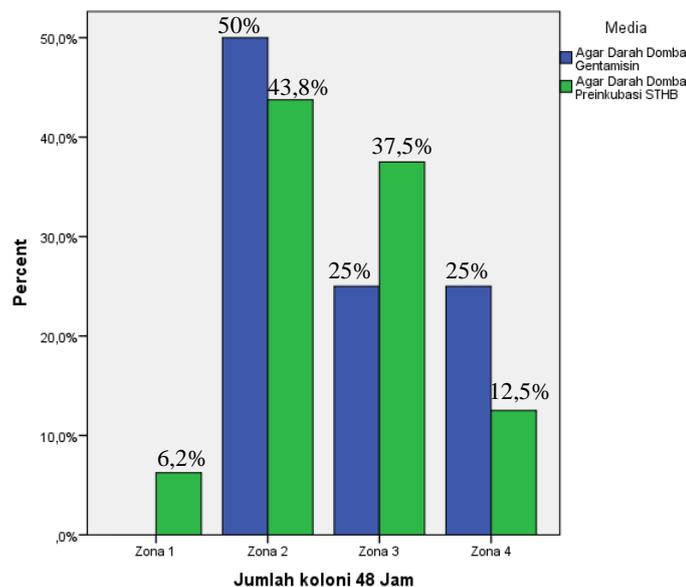


Grafik 2. Jumlah Koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 24 jam

Tabel 3. Hasil pengamatan jumlah koloni pada 48 jam

Zona	Agar darah domba gentamisin		Agar darah domba preinkubasi STHB		Nilai <i>p</i>
	N	%	N	%	
1	0	0	1	6,2	0,545 [‡]
2	8	50	7	43,8	
3	4	25	6	37,5	
4	4	25	2	12,5	
Total	16	100	16	100	

Keterangan : [‡]Chi Square



Grafik 3. Jumlah Koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 48 jam

Grafik jumlah koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 18 jam, 24 jam dan 48 jam pada kedua media menunjukkan tidak adanya peningkatan jumlah koloni. Media agar darah domba yang ditumbuhi *S.pneumoniae* pada zona 1 sebanyak 6,2%. Media agar darah domba gentamisin yang ditumbuhi *S.pneumoniae* hingga zona 2 sebanyak 50%, sedangkan media agar darah domba sebanyak 43,8%. Media agar darah domba gentamisin yang ditumbuhi *S.pneumoniae* hingga zona 3 lebih sedikit yaitu 25%, dibandingkan pada media agar darah domba sebanyak 43,8%. Sebaliknya, media agar darah domba gentamisin yang ditumbuhi *S.pneumoniae* hingga zona 4 lebih banyak yaitu 25%, dibandingkan pada media agar darah domba sebanyak 12,5%.

Analisis perbandingan jumlah koloni bakteri pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB pada 18 jam, 24 jam dan 48 jam didapat nilai p sebesar 0,545 ($p > 0,05$) maka secara statistik terdapat perbedaan namun tidak signifikan antara jumlah koloni di agar darah domba gentamisin dengan jumlah koloni di agar darah domba dengan preinkubasi STHB.

Hasil pengukuran diameter koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 18 jam, 24 jam dan 48 jam yang ditanam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

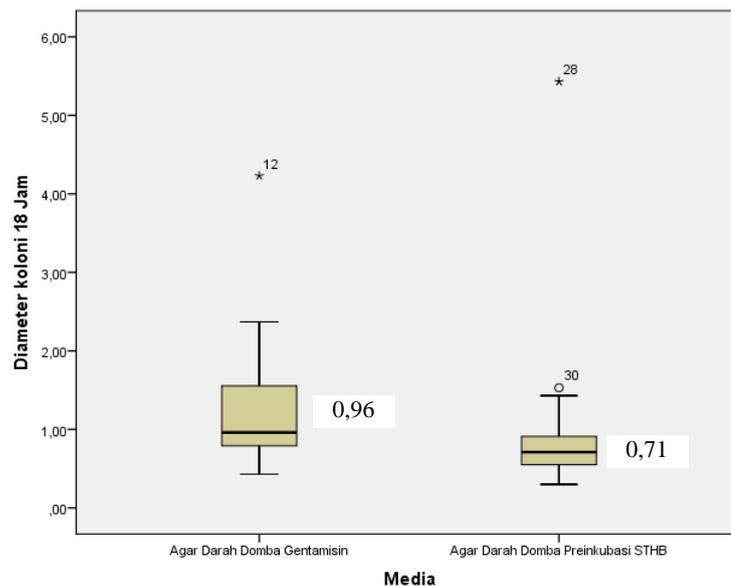
Tabel 4. Hasil pengukuran diameter koloni pada 18, 24, dan 48 jam

Media	Median (min-maks)		Nilai <i>p</i>
	Agar Darah Domba Gentamisin	Agar Darah Domba Preinkubasi STHB	
	Diameter Koloni 18 Jam	0,96 (0,43 - 4,23)	
Diameter Koloni 24 Jam	1,26 (0,50 - 4,50)	0,95 (0,40 - 5,63)	0,073 [§]
Diameter Koloni 48 Jam	1,72 (0,73 - 5,38)	1,15 (0,57 - 6,83)	0,080 [§]

Keterangan : [§]Mann Whitney

Diameter koloni pengamatan 18 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan

preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 4

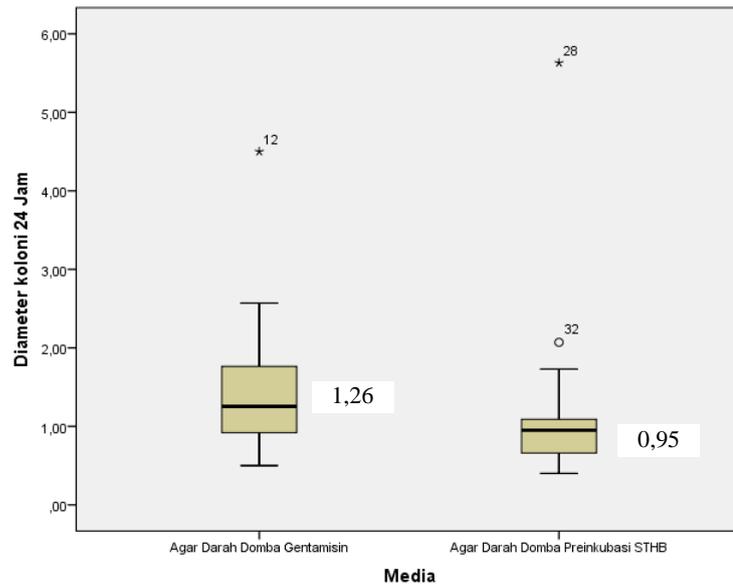


Grafik 4. Diameter Koloni 18 Jam

Data diameter koloni pada pengamatan 18 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 0,96 dengan nilai terkecil 0,43 dan nilai terbesar 4,23, sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB

memiliki nilai median 0,71 dengan nilai terkecil 0,30 dan nilai terbesar 5,43.

Diameter koloni pengamatan 24 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 5

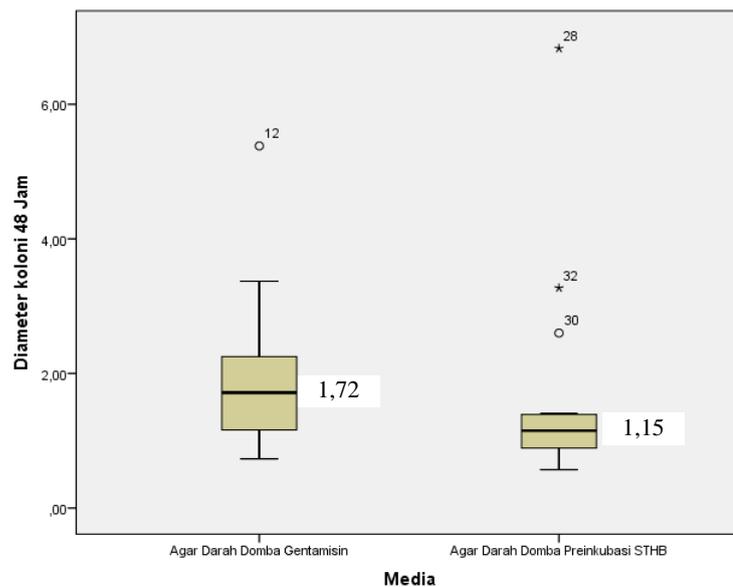


Grafik 5. Diameter Koloni 24 Jam

Data diameter koloni pada pengamatan 24 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 1,26 dengan nilai terkecil 0,50 dan nilai terbesar 4,50 sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB

memiliki nilai median 0,95 dengan nilai terkecil 0,40 dan nilai terbesar 5,63.

Diameter koloni pengamatan 48 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 6



Grafik 6. Diameter Koloni 48 Jam

Data diameter koloni pada pengamatan 48 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 1,72 dengan nilai terkecil 0,73 dan nilai terbesar 5,38, sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB memiliki nilai median 1,15 dengan nilai terkecil 0,57 dan nilai terbesar 6,83

Hasil analisis perbandingan diameter koloni inkubasi 18 jam pada kedua media menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,040$. Hal yang berbeda ditemukan pada

pengamatan 24 jam dan 48 jam. Pada inkubasi 24 jam kedua media menunjukkan perbedaan namun tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,073$. Begitu juga pada inkubasi 48 jam kedua media menunjukkan perbedaan namun tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,080$.

Hasil pengukuran diameter zona hemolisis *S.pneumoniae* pada pengamatan 18 jam, 24 jam dan 48 jam yang ditanam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

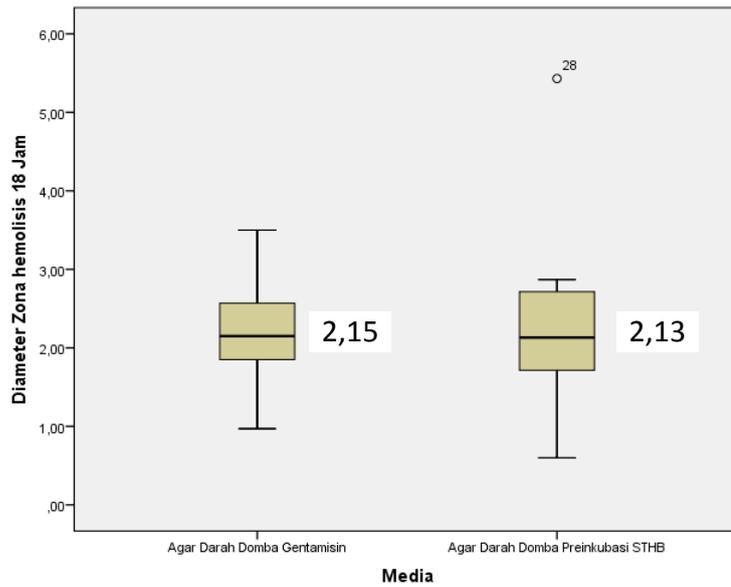
Tabel 5. Hasil pengukuran diameter zona hemolisis pada 18, 24, dan 48 jam

Media	Median (min-maks)		Nilai p
	Agar Darah Domba Gentamisin	Agar Darah Domba Preinkubasi STHB	
	Diameter Zona hemolisis 18 Jam	2,15 (0,97 - 3,50)	
Diameter Zona hemolisis 24 Jam	2,50 (1,40 - 3,70)	2,6 (1,70 - 5,67)	0,706 [§]
Diameter Zona hemolisis 48 Jam	3,38 (2,20 - 5,67)	3,34 (1,83 - 8,13)	0,485 [§]

Keterangan : [§]Mann Whitney

Diameter zona hemolisis pengamatan 18 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba

dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 7

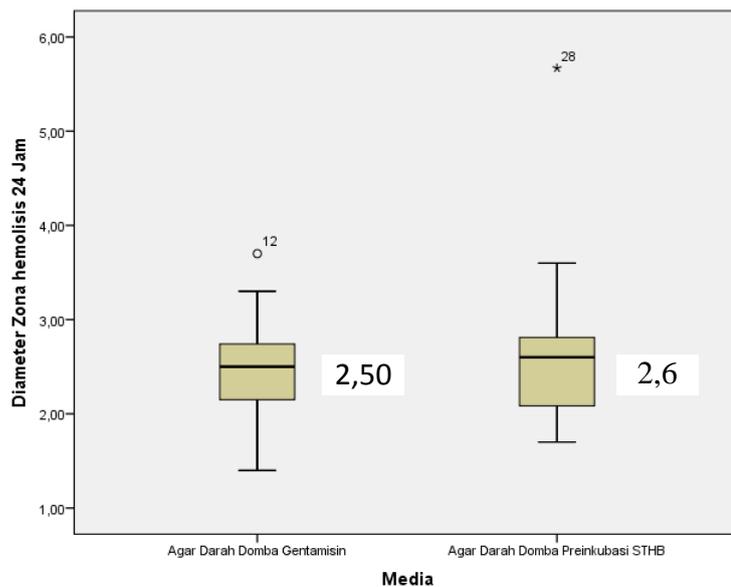


Grafik 7. Diameter Zona Hemolisis 18 Jam

Data diameter zona hemolisis pada pengamatan 18 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 2,15 dengan nilai terkecil 0,97 dan nilai terbesar 3,50, sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB

memiliki nilai median 2,13 dengan nilai terkecil 0,60 dan nilai terbesar 5,43

Diameter zona hemolisis pengamatan 24 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 5

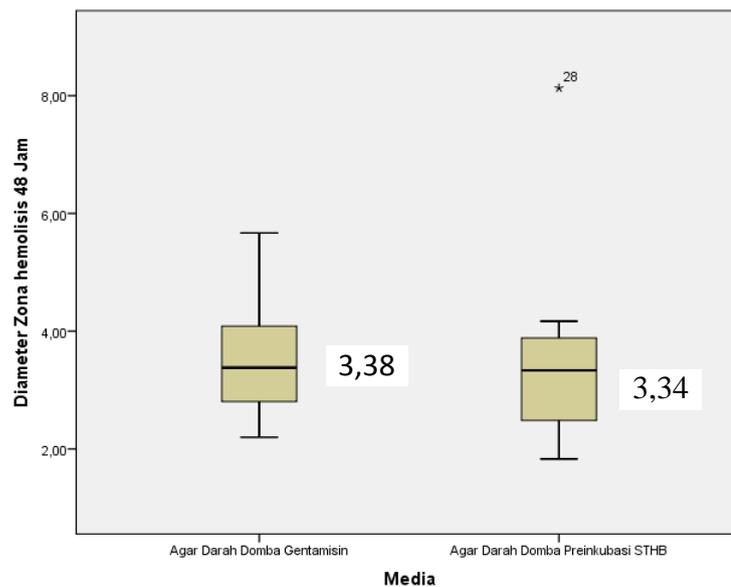


Grafik 8. Diameter Zona Hemolisis 24 Jam

Data diameter zona hemolisis pada pengamatan 24 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 2,50 dengan nilai terkecil 1,40 dan nilai terbesar 3,70, sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB

memiliki nilai median 2,6 dengan nilai terkecil 1,70 dan nilai terbesar 5,67

Diameter zona hemolisis pengamatan 48 jam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba dengan preinkubasi STHB dapat dilihat pada grafik 9



Grafik 9. Diameter Zona Hemolisis 48 Jam

Data diameter zona hemolisis pada pengamatan 48 jam memiliki distribusi yang tidak normal. Agar darah domba gentamisin memiliki nilai median 3,38 dengan nilai terkecil 2,20 dan nilai terbesar 5,67, sedangkan pada agar darah domba dengan preinkubasi STHB memiliki nilai median 3,34 dengan nilai terkecil 1,83 dan nilai terbesar 8,13

Hasil analisis perbandingan diameter zona hemolisis inkubasi 18 jam, 24 jam dan 48 jam pada kedua media menunjukkan perbedaan namun tidak

bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,806$ pada pengamatan 18 jam. Pada pengamatan 24 jam nilai $p = 0,706$, sedangkan pengamatan 48 jam nilai $p = 0,485$.

S.pneumoniae memiliki karakteristik koloni yang khas. Penilaian karakteristik koloni didasarkan pada mudah tidaknya koloni *S.pneumoniae* dibedakan dengan koloni bakteri lain yang tumbuh di media agar. Koloni *S.pneumoniae* pada agar darah mudah dibedakan bila berbentuk bulat kecil

berdiameter 1-3 mm, mencekung atau datar dan menghasilkan hemolisis α .

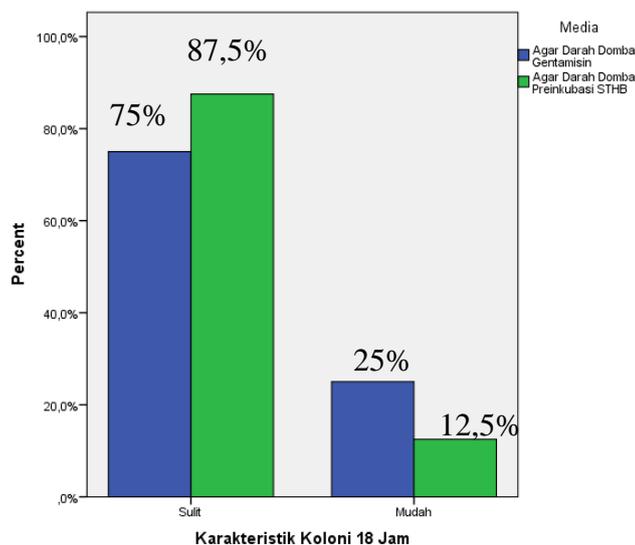
Pengamatan karakteristik koloni *S.pneumoniae* kedua media dilakukan pada

18 jam, 24 jam dan 48 jam.. Hasil pengamatan karakteristik koloni dijelaskan pada tabel dan grafik dibawah ini

Tabel 6. Hasil pengamatan karakteritik koloni pada 18 jam

Karakteristik koloni	Agar darah domba gentamisin		Agar darah domba preinkubasi STHB		Nilai p
	N	%	N	%	
Sulit dibedakan	12	75	14	87,5	0,654 [€]
Mudah dibedakan	4	25	2	12,5	
Total	16	100	16	100	

Keterangan : [€]Fisher,s Exact



Grafik 10. Karakteristik Koloni 18 jam

Karakteristik koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 18 jam, menunjukkan lebih banyak koloni dalam plate yang sulit diidentifikasi. Pada media agar darah domba gentamisin, koloni *S.pneumoniae* yang sulit dibedakan sebanyak 75%,

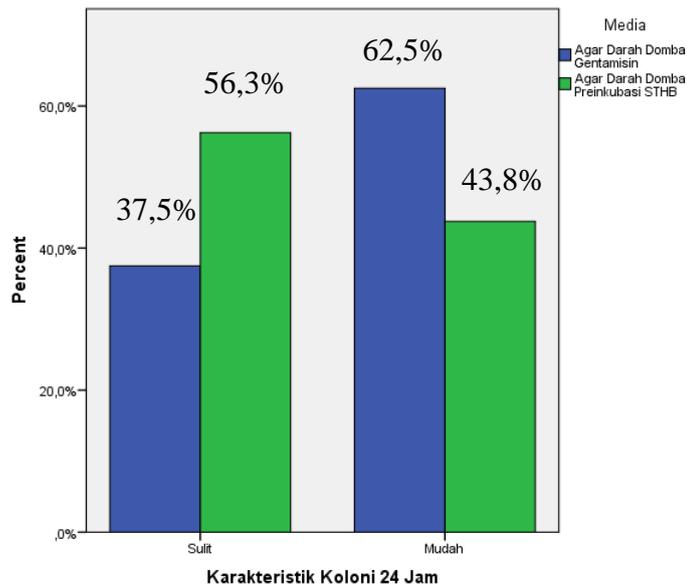
sedangkan yang mudah diidentifikasi sebanyak 25%. Koloni *S.pneumoniae* pada media agar darah domba yang sulit dibedakan sebanyak 87,5% dan yang mudah dibedakan dengan bakteri lain sebanyak 12,5%.

Tabel 7. Hasil pengamatan karakteritik koloni pada 24 jam

Karakteristik	Agar darah domba gentamisin	Agar darah domba preinkubasi STHB	Nilai p
---------------	-----------------------------	-----------------------------------	---------

koloni	N	%	N	%	
Sulit dibedakan	6	37,5	9	56,3	
Mudah dibedakan	10	62,5	7	43,8	0,479 ^e
Total	16	100	16	100	

Keterangan : ^eFisher,s Exact



Grafik 11. Karakteristik Koloni 24 jam

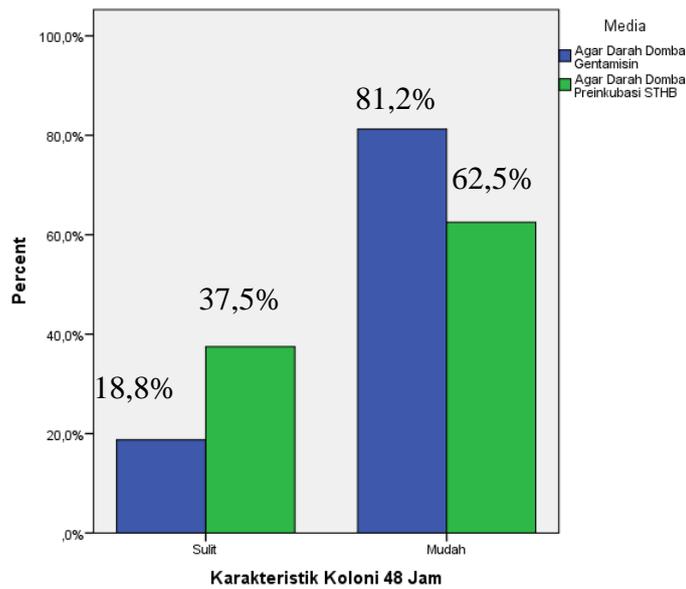
Pada pengamatan 24 jam, lebih banyak koloni yang mudah dibedakan pada plate agar. Pada media agar darah domba gentamisin, koloni *S.pneumoniae* yang sulit dibedakan sebanyak 37,5%, sedangkan yang mudah diidentifikasi

sebanyak 62,5%. Koloni *S.pneumoniae* pada media agar darah domba yang sulit dibedakan sebanyak 56,3% dan yang mudah dibedakan dengan bakteri lain sebanyak 43,8%

Tabel 8. Hasil pengamatan karakteritik koloni pada 48 jam

Karakteristik koloni	Agar darah domba gentamisin		Agar darah domba preinkubasi STHB		Nilai p
	N	%	N	%	
Sulit dibedakan	3	18,8	6	37,5	
Mudah dibedakan	13	81,2	10	62,5	0,433 ^e
Total	16	100	16	100	

Keterangan : ^eFisher,s Exact



Grafik 12. Karakteristik Koloni 48 jam

Pada pengamatan 48 jam, lebih banyak plate agar yang menumbuhkan koloni *S.pneumoniae* dengan karakteristik khas sehingga mudah dibedakan dengan bakteri lain. Pada media agar darah domba gentamisin, koloni *S.pneumoniae* yang sulit dibedakan sebanyak 18,8%, sedangkan yang mudah diidentifikasi sebanyak 81,2%. Koloni *S.pneumoniae* pada media agar darah domba yang sulit dibedakan sebanyak 37,5% dan yang mudah dibedakan dengan bakteri lain sebanyak 62,5%.

Hasil analisis perbandingan karakteristik koloni inkubasi 18 jam, 24 jam dan 48 jam pada kedua media menunjukkan perbedaan namun tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,654$ pada pengamatan 18 jam. Pada pengamatan 24 jam nilai $p = 0,479$,

sedangkan pengamatan 48 jam nilai $p = 0,433$.



Gambar 1. Koloni *S.pneumoniae* pada agar darah domba gentamisin



Gambar 2. Koloni *S.pneumoniae* pada agar darah domba

PEMBAHASAN

Di negara-negara maju, media agar darah domba menjadi media agar darah standar untuk menumbuhkan *S.pneumoniae*.^{11,12} Media agar darah domba dan gentamisin 5µg/ml merupakan media selektif untuk menumbuhkan *S.pneumoniae* yang berasal dari spesimen swab nasofaring, namun hal tersebut masih sulit dilakukan karena *S.pneumoniae* bersifat *fastidious*, sehingga diperlukan media khusus untuk mengkultur bakteri tersebut.¹³

Preinkubasi *S.pneumoniae* pada *Supplemented Todd Hewith Broth* (STHB) sebelum dilakukan penanaman spesimen pada media agar darah domba dapat meningkatkan jumlah spesimen yang terbukti positif mengandung *S.pneumoniae*. Preinkubasi dalam STHB meningkatkan pertumbuhan strain

minoritas hingga pada level yang dapat dideteksi melalui kultur pada agar darah.¹⁵

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah domba dengan preinkubasi dalam STHB dari spesimen swab nasofaring dibandingkan dengan media agar darah domba gentamisin tanpa preinkubasi dalam STHB.

Penelitian ini menggunakan sampel yang berasal dari swab nasofaring balita sehat yang disimpan dalam media STGG pada temperatur -80°C yang telah disimpan selama satu tahun. Besar sampel yang dibutuhkan untuk tiap perlakuan yaitu 16. Pada perlakuan pertama, 16 swab nasofaring di inkubasi pada *Supplemented Todd Hewitt Broth* (STHB) selama 4-6 jam, kemudian di streak pada media agar darah domba. Perlakuan kedua, keenambelas swab nasofaring langsung distreak pada media agar darah domba gentamisin.

Preinkubasi swab nasofaring dalam STHB dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Carvalho *et al.* Preinkubasi dalam STHB meningkatkan jumlah spesimen *S.pneumoniae* yang dapat diidentifikasi dan juga meningkatkan deteksi *multiple serotipe* melalui metode kultur ataupun molekular. Preinkubasi STHB meningkatkan pertumbuhan strain

minoritas hingga pada level yang dapat dideteksi melalui subkultur pada agar darah.¹⁵

Bakteri *S.pneumoniae* ditanam pada media agar darah domba gentamisin dan agar darah domba kemudian diamati pola pertumbuhannya dalam 18 jam, 24 jam dan 48 jam yang mencakup diameter koloni, diameter hemolisis, jumlah koloni, dan karakteristik koloni *S. pneumoniae*.

Pengamatan pertumbuhan koloni *S.pneumoniae* pada 18 jam, 24 jam, dan 48 jam pada kedua media menunjukkan tidak adanya peningkatan jumlah koloni. Jumlah koloni paling banyak tumbuh hingga zona dua pada kedua media. Terdapat perbedaan jumlah koloni pada kedua media namun tidak signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Russell *et al*, jumlah koloni *S.pneumoniae* yang ditanam pada agar darah domba sitrat, agar darah domba defibrinasi, agar darah manusia adalah sama.⁹

Diameter koloni *S. pneumoniae* pada agar darah domba gentamisin menghasilkan koloni yang lebih besar dibandingkan dengan media agar darah domba dengan preinkubasi STHB. Diameter koloni kedua media pada pengamatan 18 jam memiliki perbedaan signifikan. Pengamatan 24 dan 48 jam

diameter koloni kedua media terdapat perbedaan namun tidak signifikan.

Media agar darah domba tanpa penambahan gentamisin tidak selektif terhadap *S. pneumoniae*.¹³ Spesimen swab nasofaring memiliki cukup banyak bakteri lain yang melakukan kolonisasi bersama *S. pneumoniae*. Bakteri tersebut dapat menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* pada media agar darah domba.¹⁴

Dalam suatu penelitian yang dilakukan oleh Farida *et al* pada balita di Semarang, Indonesia, karier *Klebsiella pneumoniae* sebesar 7% dan karier bakteri Gram negatif lain sebesar 20%. Tingginya angka bakteri lain yang melakukan kolonisasi bersama *S.pneumoniae* tentu dapat menghambat pertumbuhan *S.pneumoniae* karena bakteri tersebut saling berkompetisi untuk mendapatkan nutrisi pada media agar darah.¹⁴

Diameter zona hemolisis *S. pneumoniae* pada agar darah domba gentamisin menghasilkan koloni yang lebih besar pada pengamatan 18 jam dan 48 jam dibandingkan dengan media agar darah domba dengan preinkubasi STHB. Diameter zona hemolisis kedua media pada pengamatan 18 jam, 24 jam dan 48 jam memiliki perbedaan namun tidak bermakna.

Penelitian Russell *et al* menjabarkan bahwa sifat hemolisis alfa
JKD, Vol. 7, No. 1, Januari 2018 : 219-239

dari *S. pneumoniae* dapat dilihat dengan baik pada media agar darah domba dan kuda. *Keduanya* menunjukkan hemolisis alfa yang tampak jelas, dengan zona hemolisis 1 mm untuk media agar darah kuda serta media agar darah domba terdefibrinasi, dan 1 – 1,5 mm untuk media agar darah domba sitras.⁹

Darah domba memiliki kandungan *sphyngomielin* yang tinggi yaitu 51 %. Hal ini mempengaruhi kecepatan lisis dari eritrosit darah domba. Faktor lain yang mempengaruhi mudahnya aktivitas lisis dari eritrosit domba adalah modulasi permukaan dari aktivasi jalur klasik yaitu pembentukan C2 dan C3 konvertase. Selain itu, diameter eritrosit domba yang kecil dan membran sel yang tipis juga memudahkan lisis dari darah domba.¹⁶

Perbedaan jumlah koloni, diameter koloni dan diameter hemolisis *S.pneumoniae* yang tidak signifikan pada kedua media mengindikasikan bahwa kedua media sama baiknya dalam menumbuhkan *S.pneumoniae*. Hal ini dikarenakan, preinkubasi swab nasofaring pada STHB dapat meningkatkan pertumbuhan *S.pneumoniae* sebelum dilakukan kultur pada media agar darah, sehingga keberadaan bakteri lain tidak bermakna dalam menghambat pertumbuhan *S.pneumoniae* pada agar darah.

Penilaian karakteristik koloni didasarkan pada mudah tidaknya koloni *S.pneumoniae* dibedakan dengan koloni bakteri lain yang tumbuh di media agar. Koloni *S. pneumoniae* dalam agar darah domba gentamisin dan agar darah domba memiliki karakteristik khas yang dapat dibedakan dengan bakteri lain pada pengamatan 18 jam, 24 jam dan 48 jam. Koloni *S.pneumoniae* dalam agar darah adalah bulat kecil *berdiameter 1 - 3 mm dan membentuk zona hemolitik- α yang berwarna hijau..* Pertumbuhan pada 18-24 jam pertama koloni berbentuk kubah (dome-shaped), selanjutnya koloni akan semakin rata dan mencekung (umbilikasi) pada bagian tengah *Pada penelitian ini, karakteristik koloni mudah dibedakan apabila koloni S.pneumoniae berdiameter 1-3 mm, permukaan mencekung, basah/glossy dan menghasilkan α hemolisis.*^{9,17}

Penelitian yang dilakukan oleh, Allegrucci *et al* menunjukkan bahwa serotipe yang berbeda memiliki gambaran koloni yang berbeda pula pada agar darah. Diameter koloni *S.pneumoniae* memiliki ukuran yang bervariasi, perbedaan ukuran koloni tersebut tergantung pada jenis serotipe *S.pneumoniae* yang tumbuh. Diameter koloni *S.pneumoniae* umumnya berukuran 1-3 mm. Diameter koloni *S.pneumoniae* dapat berukuran kecil (1-

1,5 mm), sedang(2,-3mm) dan besar (4-5mm).⁴

Pengamatan 18 jam menunjukkan banyak koloni dalam plate yang sulit diidentifikasi. Media agar darah domba dengan preinkubasi STHB lebih banyak yang sulit dibedakan dibandingkan dengan media agar darah domba gentamisin, namun perbedaan tersebut tidak signifikan. Hal ini dikarenakan masih banyak koloni yang berbentuk kubah (*dome shape*) dan diameter kurang dari 1 mm. Pengamatan 24 jam koloni yang mudah diidentifikasi semakin banyak. Hal ini dikarenakan koloni sudah banyak yang mulai mengalami umbilikasi. Begitu juga pada pengamatan 48 jam koloni yang mudah dibedakan semakin banyak karena ukuran koloni sudah berukuran 1-3 mm. Karakteristik koloni *S.pneumoniae* pada pengamatan 24 jam memiliki gambaran koloni yang terbaik karena pada waktu ini gambaran koloni sudah mudah dibedakan dan tidak terhalangi oleh pertumbuhan bakteri lain. Hal ini sesuai dengan dengan penelitian Nye *et al* dan Lestari yang menyarankan bahwa *S. pneumoniae* pada agar darah akan lebih baik dilakukan pengamatan pada 24 jam dan 48 jam karena karakteristik dan pola pertumbuhannya akan lebih jelas terlihat.^{18,19}

Keterbatasan penelitian ini adalah ketebalan media agar yang digunakan tidak selalu sama. Keterbatasan alat menyebabkan *pengukuran* ketebalan media menjadi kurang akurat. Jenis darah domba yang digunakan juga tidak seragam. Darah domba yang dipakai pada penelitian ini adalah darah domba sitrat dan defibrinasi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah domba dengan preinkubasi dalam STHB dari spesimen swab nasofaring dibandingkan dengan media agar darah domba gentamisin tanpa preinkubasi dalam STHB memiliki perbedaan dari jumlah koloni, diameter koloni, diameter zona hemolisis dan karakteristik kolon, namun tidak signifikan. Pertumbuhan *S.pneumoniae* yang ditanam pada agar darah domba dengan preinkubasi dalam STHB tidak lebih baik daripada yang ditanam langsung pada agar darah domba gentamisin.

Saran

Kultur *S.pneumoniae* yang berasal dari sampel swab nasofaring sebaiknya menggunakan agar darah domba yang memiliki gentamisin setelah dipreinkubasi dalam STHB. Hal ini bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain yang kolonisasi bersama *S.pneumoniae*,

sehingga pertumbuhan *S.pneumoniae* bisa optimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Korona-Glowniak I, Niedzielski A, Malm A. Upper Respiratory Colonization by *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Pre-school Children in South-East Poland. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(12):1529-34. doi:10.1016/j.ijporl.2011.08.021.
2. Hadinegoro SR, Prayitno A, Khoeri MM, et al. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus Pneumoniae* in Healthy Children Under Five Years Old in Central Lombok Regency, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016;47(3):485-93.
3. Battig P, Hathaway LJ, Hofer S, Muhlemann K. Serotype-Specific Invasiveness and Colonization Prevalence in *Streptococcus pneumoniae* Correlate with the Lag Phase during In Vitro Growth. *Microbes Infect.* 2006;8:2612-7. doi:10.1016/j.micinf.2006.07.013.
4. Allegrucci M, Sauer K. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms. *J Bacteriol.* 2007;189(5):2030-8. doi:10.1128/JB.01369-06.
5. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The Role of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):288-301. doi:10.1038/nrmicro1871.
6. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of Disease Caused by *Streptococcus pneumoniae* in Children Younger than 5 years: Global Estimates. *Lancet.* 2009;374(9693):893-902. doi:10.1016/S0140-6736(09)61204-6.
7. Jauneikaite E, Jefferies JM, Hibberd ML, Clarke SC. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* Serotypes Causing Invasive and Non-invasive Disease in South East Asia: A Review. *Vaccine.* 2012;30(24):3503-3514. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.066.
8. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Pneumonia Balita.* Buletin Jendela Epidemiologi; 2010.
9. Russell FM, Biribo SSN, Selvaraj G, et al. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3346-51. doi:10.1128/JCM.02631-05.
10. Ehara N, Fukushima K, Kakeya H, et al. A Novel Method for Rapid Detection of *Streptococcus pneumoniae* Antigen in Sputum and Its Application in Adult Respiratory Tract Infections. *J Med Microbiol.* 2008;57:820-826. doi:10.1099/jmm.0.47793-0.
11. Anand C, Gordon R, Shaw H, Fonseca K, Olsen M. Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):591-4.
12. Egwuatu TO, Ogunsola FT, Okodugha IM, Jide B. Effect of Blood Agar from Different Animal Blood on Growth Rates and Morphology of Common Pathogenic Bacteria. *Adv Microbiol.* 2014;4(December):1237-41.
13. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, et al. Standard Method for Detecting Upper Respiratory Carriage of *Streptococcus pneumoniae*: **JKD**, Vol. 7, No. 1, Januari 2018 : 219-239

- Updated Recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine*. 2013;32(1):165-79. doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.062.
14. Farida H, Gasem MH, Keuter M, Hermans PWM, Wahyono H, Verbrugh HA. Nasopharyngeal Carriage of *Klebsiella pneumoniae* and Other Gram- Negative Bacilli in Pneumonia-Prone Age Groups in Semarang, Indonesia. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1614-6. doi:10.1128/JCM.00589-13.
15. Carvalho MDG, Pimenta FC, Jackson D, et al. Revisiting Pneumococcal Carriage by Use of Broth Enrichment and PCR Techniques for Enhanced Detection of Carriage and Serotypes. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1611-8. doi:10.1128/JCM.02243-09.
16. Yeh E, Pinsky BA, Banaei N, Baron EJ. Hair Sheep Blood, Citrated or Defibrinated, Fulfills All Requirements of Blood Agar for Diagnostic Microbiology Laboratory Tests. *PLoS One*. 2009;4(7). doi:10.1371/journal.pone.0006141.
17. Jawetz, Melnick, Adelbergs. *Medical Microbiology*. 27th ed. New York: McGraw-Hill; 2016.
18. Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolated blood agar in the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from sputum. *J Med Microbiol*. 1999;48(12):1111-14.
19. Lestari A, Pendidikan P, Kedokteran S, Kedokteran F, Diponegoro U. Modifikasi Kadar Hematokrit Darah Manusia Untuk Mengoptimalkan Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* Pada Media Agar Darah Manusia Jurnal Media Medika Muda. 2012.