



**PENGARUH PENINGKATAN KADAR HEMOGLOBIN
TERHADAP PERTUMBUHAN *Haemophilus influenzae* PADA
MEDIA AGAR COKLAT DARI DARAH MANUSIA**

*THE EFFECT OF ENHANCED HEMOGLOBIN LEVE TOWARDS *Haemophilus influenzae* GROWTH in CHOCOLATE AGAR MEDIUM MADE FROM HUMAN BLOOD*

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai derajat
sarjana strata-1 kedokteran umum**

**RISANG BAGASKORO
G2A 007 151**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
2011**

PENGARUH PENINGKATAN KADAR HEMOGLOBIN TERHADAP PERTUMBUHAN *Haemophilus influenzae* pada MEDIA AGAR COKLAT dari DARAH MANUSIA

Risang Bagaskoro¹, Helmia Farida²

ABSTRAK

Latar Belakang: *Haemophilus influenzae* adalah bakteri *fastidious* penyebab pneumonia dan meningitis. Agar coklat dari darah domba (ACD) merupakan standar baku media pertumbuhan *H. influenzae*. Kesulitan dalam penyediaan darah domba di negara tropis merupakan kendala mengkultur *H. influenzae*, sedangkan penggunaan darah manusia (ACM) yang lebih mudah penyediannya tidak direkomendasikan untuk kultur. Penelitian ini bertujuan mencari alternatif media kultur dari agar coklat dari darah manusia dengan modifikasi peningkatan kadar hemoglobin.

Metode: Penelitian ini menggunakan desain *True experimental post test only*. Sebelas strain kuman *H. influenzae* ditanam pada media ACD, ACM, dan ACMHb kemudian diinkubasikan selama 24 dan 48 jam. Diameter, jumlah, dan karakteristik koloni adalah hal yang dinilai pada media hasil inkubasi pada suspensi murni, sedangkan penilaian untuk suspensi *spike* sputum meliputi diameter dan karakteristik koloni.

Hasil: Setelah inkubasi 24 dan 48 jam menunjukkan diameter koloni *H. influenzae* pada media ACMHb lebih besar dari ACM ($p > 0,05$), namun lebih kecil dibandingkan dengan ACD ($p < 0,05$). Berbeda pada suspensi yang *dispike* ke dalam sputum baik pada inkubasi 24 maupun 48 jam, diameter koloni ACMHb sama baiknya bila dibandingkan dengan ACD ($p = 0,64$) dan lebih besar dibandingkan ACM ($p = 0,002$). Jumlah koloni dan karakteristik tidak berbeda bermakna pada setiap media baik pada suspensi murni dan suspensi yang *dispike* ke dalam sputum ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Media agar coklat dari darah manusia dengan modifikasi Hb (ACMHb) layak sebagai alternatif media kultur *H. influenzae* dapat menumbuhkan *H. influenzae* dengan karakteristik yang tetap terjaga.

Kata Kunci : *Haemophilus influenzae*, Hemoglobin, agar coklat, darah manusia

¹ Mahasiswa program pendidikan S-1 Kedokteran umum FK Undip

² Staf pengajar Bagian Mikrobiologi Klinik FK Undip, JL. dr. Sutomo No.18, Semarang

**THE EFFECT OF ENHANCED HEMOGLOBIN LEVEL TOWARDS
Haemophilus influenzae GROWTH in CHOCOLATE AGAR MEDIUM MADE
FROM HUMAN BLOOD**

ABSTRACT

Background: *Haemophilus influenzae* is a fastidious bacteria that causes meningitis and pneumonia. Chocolate agar made from sheep blood is the gold standard for cultivating media, but there is limitation in sheep blood availability in many countries. Human blood is cheaper and easy to provide, but not recommended for cultivating this bacteria. This research aimed to find the alternative media made from human blood by modification in enhanced hemoglobin level.

Methods: This research was true experimental post test only study. Eleven strains were cultivated on sheep blood derived chocolate agar (SCA), human blood derived chocolate agar (HCA), and Hb modified human blood derived chocolate agar (HCA-Hb). Growth was evaluated on 24 and 48 hour based on diameter of the colonies, colony count, and characteristic of the colonies. In addition the strains were spiked into sputum and cultured on the same types of media. Growth was evaluated based on diameter and characteristic of colonies.

Result: After 24 and 48 hours incubation, diameter of colony from pure suspension of *H. influenzae* on HCA-Hb was bigger than that on HCA ($p > 0,05$), but smaller than that on SCA ($p < 0,05$). However, diameter colony of *H. influenzae* which was spiked into sputum and cultured on HCA-Hb was similar to that on SCA ($p = 0,064$) and bigger than that on HCA ($p = 0,002$). There was no differences of colony and characteristics on all media type ($p > 0,05$).

Conclusion: Chocolate agar made from human blood and modified by enhanced hemoglobin level can be used as an alternative media to cultivate *H. influenzae*.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, hemoglobin, chocolate agar, human blood

PENDAHULUAN

Haemophilus influenzae adalah kelompok bakteri berukuran kecil, gram-negatif, dan pleomorfik. Bakteri ini merupakan salah satu patogen manusia yang penting. Saat ini, *Haemophilus influenzae* adalah penyebab meningitis bakteri yang paling sering pada anak usia lima bulan sampai lima tahun di Amerika Serikat.¹ Namun, bakteri ini bersifat *fastidious* karena membutuhkan hemin (faktor X) dan NAD (faktor V) dalam pertumbuhannya serta perlu diinkubasi pada suhu 35°C dengan konsentrasi CO₂ 5,5% sehingga data mengenai infeksi oleh *Haemophilus influenzae* jarang didapat.²

Pertumbuhan *Haemophilus influenzae* umumnya dilakukan pada agar coklat dari darah domba karena faktor pertumbuhan yang dibutuhkan tersebut banyak terdapat di dalam darah domba dan darah domba sedikit sekali mengandung zat-zat yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada manusia. Darah domba yang dipanaskan pada suhu optimal dapat melisis eritrosit tanpa merusak faktor X dan V tersebut. Selain ideal untuk menumbuhkan *Haemophilus influenzae*, darah domba juga ideal untuk menumbuhkan bakteri lain seperti *Streptococcus pneumoniae* dan melakukan uji diagnostik mikrobiologi seperti test CAMP.³

Sayangnya, penggunaan darah domba pada pembuatan agar coklat juga menimbulkan hambatan tersendiri, khususnya di negara-negara berkembang. Di negara-negara maju seperti Amerika Utara dan Eropa, media agar coklat dari darah domba merupakan media standar untuk

pemeriksaan mikrobiologi yang menggunakan media darah, hal ini didukung oleh teknologi pembuatan agar coklat yang ditangani secara profesional dan sistematis. Namun, di negara-negara berkembang seperti Indonesia tidak menggunakan darah domba sebagai sumber nutrisi dalam pembuatan agar coklat. Hal ini disebabkan karena penggunaan darah domba sangat tidak praktis dan membutuhkan biaya yang mahal. Laboratorium hewan komersial di negara-negara maju menggunakan pengaduk magnetik untuk mendefibrinasi darah selama pengumpulan. Peralatan tersebut tidak mudah didapatkan di negara berkembang karena biayanya mahal. Dengan demikian, sulit untuk mendapatkan darah terdefibrinasi dalam jumlah besar. Penggunaan jasa impor untuk mendatangkan darah domba terdefibrinasi dalam jumlah besar sangat tidak memungkinkan karena biayanya yang diperlukan sangat besar.³

Oleh sebab itu, di negara berkembang seperti Indonesia, penggunaan agar coklat dari darah manusia sebagai pengganti agar coklat dari darah domba rutin dilakukan. Hal ini dikarenakan biaya yang harus dikeluarkan menjadi lebih murah.

Namun, banyak bakteri patogen yang gagal tumbuh sempurna atau terdapat perbedaan morfologi jika dibiakkan di media agar coklat dari darah manusia termasuk *Haemophilus influenza*. Oleh karena itu, diperlukan modifikasi dalam pembuatan agar coklat dari darah manusia sehingga dapat menumbuhkan *Haemophilus influenzae* sebaik pertumbuhannya di media agar coklat dari darah domba.

Dalam penelitian ini, dilakukan modifikasi dengan menggunakan *packed red cell* dalam pembuatan agar coklat dari darah manusia. Peningkatan kadar Hb dalam *packed red cell* diharapkan mampu meningkatkan pasokan hemin sebagai unsur yang diperlukan *Haemophilus influenzae* dalam pertumbuhannya. Semakin banyak eritrosit yang ditambahkan semakin banyak pula hemoglobin di dalam agar coklat darah manusia tersebut. Apabila eritrosit tersebut dilisiskan maka akan banyak pula hemin yang dilepaskan. Dengan demikian, diharapkan pertumbuhan *Haemophilus influenzae* menjadi lebih baik pertumbuhannya dibandingkan pada agar coklat darah manusia standar.

METODE

Penelitian ini mempunyai ruang lingkup keilmuan mikrobiologi klinik dan dilakukan pada bulan Maret 2011 di laboratorium mikrobiologi fakultas kedokteran universitas diponegoro. Desain penelitian ini berupa *true experimental post test only*.

Variabel bebas penelitian berupa jenis agar coklat yang terbuat dari darah domba, darah manusia, dan darah manusia dengan modifikasi Hb. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah pertumbuhan *H. influenzae* yang dilihat dari diameter, jumlah, dan karakteristik koloni yang terdiri dari suspensi murni dan suspensi yang di-*spike* ke dalam sputum. Jumlah sampel yang digunakan adalah sampel segar yang berumur 18 – 24 jam. Sampel terdiri dari satu strain ATCC 49427 dan sepuluh strain isolat klinik.

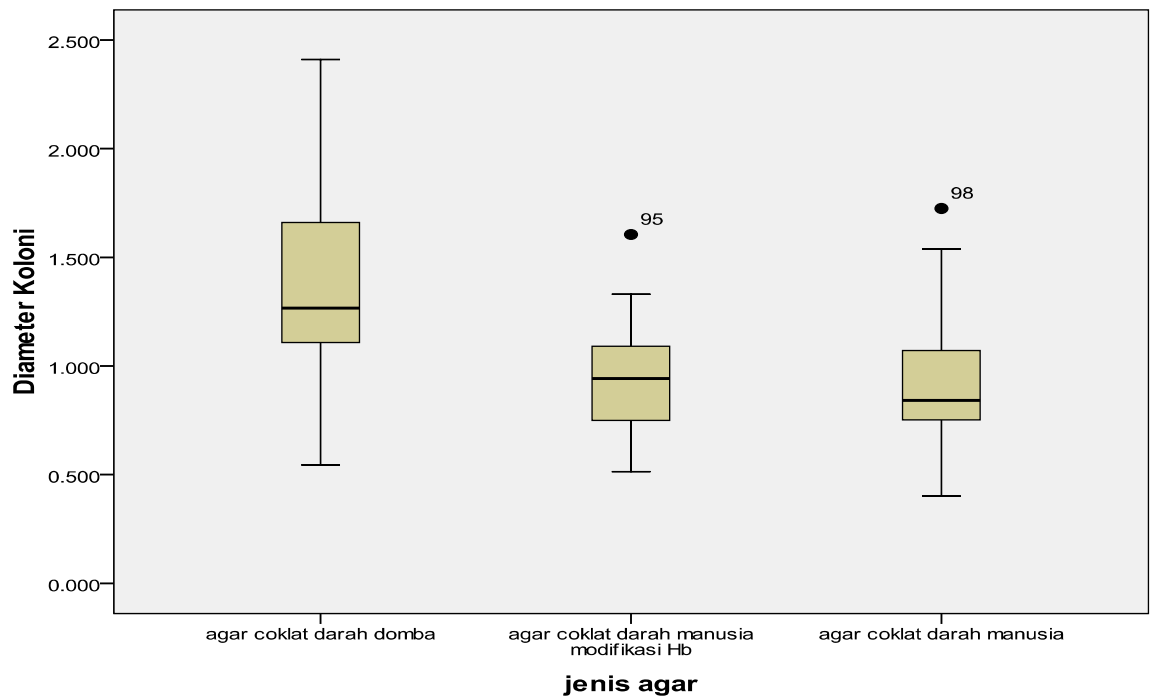
Suspensi kuman *H. influenzae* dengan densitas kuman 0,5 Mac Farland diencerkan dengan NaCl fisiologis hingga 1:5000 kemudian dilakukan *streak* penuh pada ketiga media. Suspensi kuman 0,5 mac farland yang telah diencerkan tersebut juga dicampur dengan sputum pasien infeksi saluran napas bawah yang bukan disebabkan oleh *H. influenzae* kemudian dibuat homogen dengan vortex. Suspensi kuman yang di-*spike* ke dalam sputum diinokulasikan pada ketiga media dengan cara *streak* empat zona. Media yang sudah ditanami kuman *H. influenzae* diinkubasikan selama 24 jam dan 48 jam kemudian diamati hasilnya.

Pengamatan yang dilakukan meliputi mengukur diameter koloni, menghitung jumlah koloni, serta mengamati karakteristik koloni yang terdiri dari fisik dan bau. Diameter dan jumlah koloni dihitung secara manual dengan menggunakan bantuan Adobe photoshop sehingga koloni tampak lebih jelas.

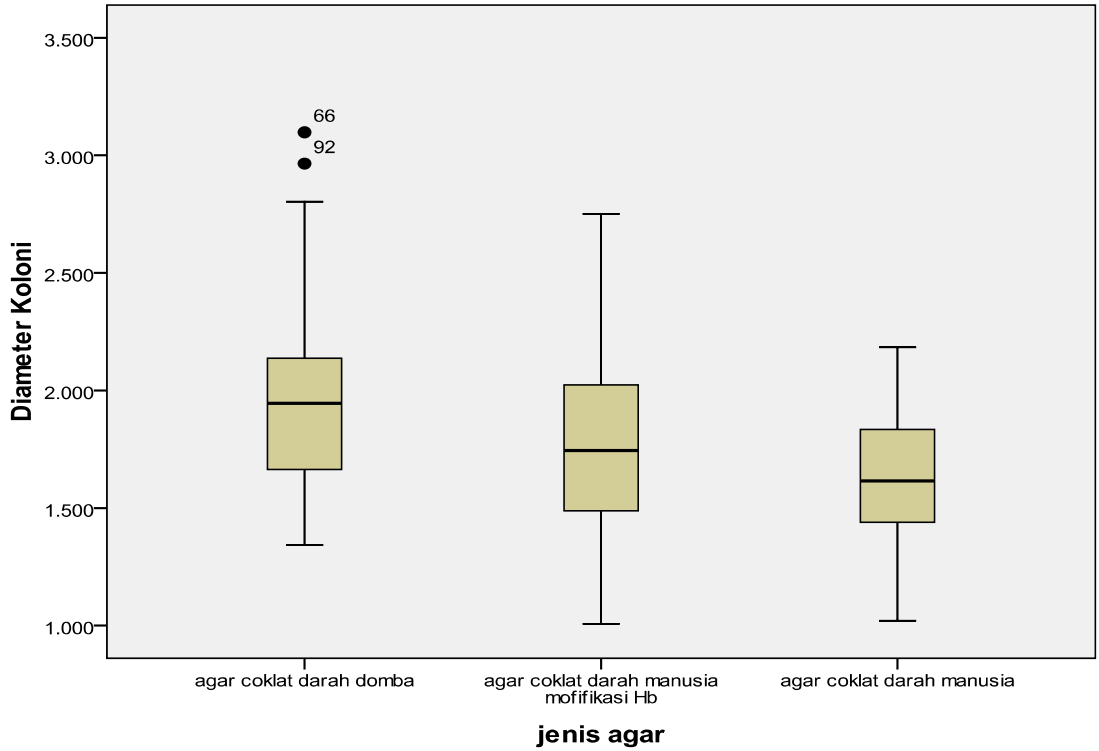
Diameter koloni merupakan skala numerik yang diuji menggunakan one way Anova. Jumlah koloni dan karakteristik berupa skala nominal/ordinal yang diuji menggunakan kolmogorov smirnov sebagai alternatif. Normalitas sebaran data diuji dengan Shapiro Wilk

HASIL PENELITIAN

Gambaran pertumbuhan koloni *H. influenzae* pada ACD, ACM, dan ACMHb ditampilkan pada grafik berikut:



Grafik 1. Diameter koloni 24 jam. Nilai $p = 0.00$ (uji One Way Anova)

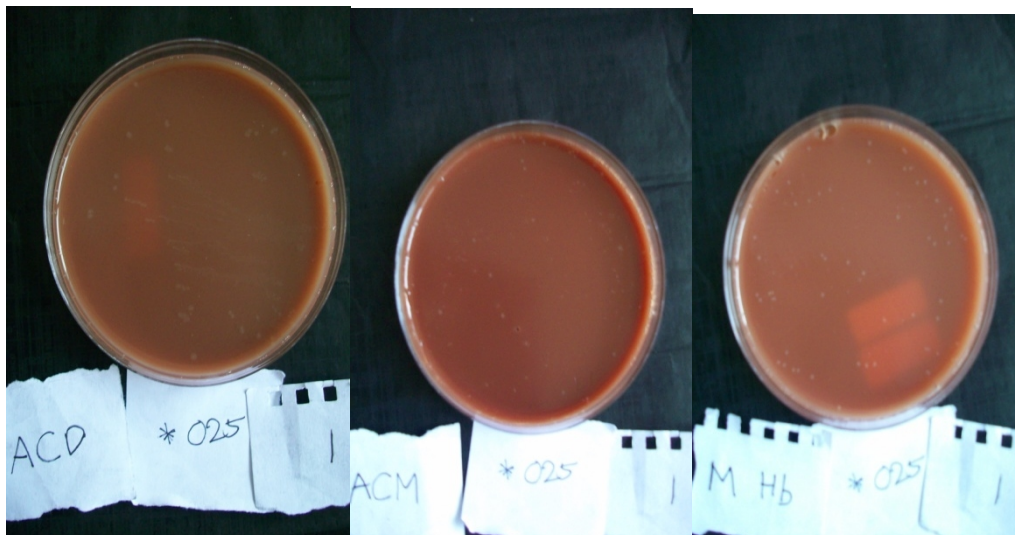


Grafik 2. Diameter koloni 48 jam. Nilai $p= 0,03$ (Uji One Way Anova)

Analisa Post	ACD		ACM		
		24 Jam	48 Jam	24 Jam	48 Jam
Hoc LSD					
ACMHb		0,000*	0,036*	0,491	0,194

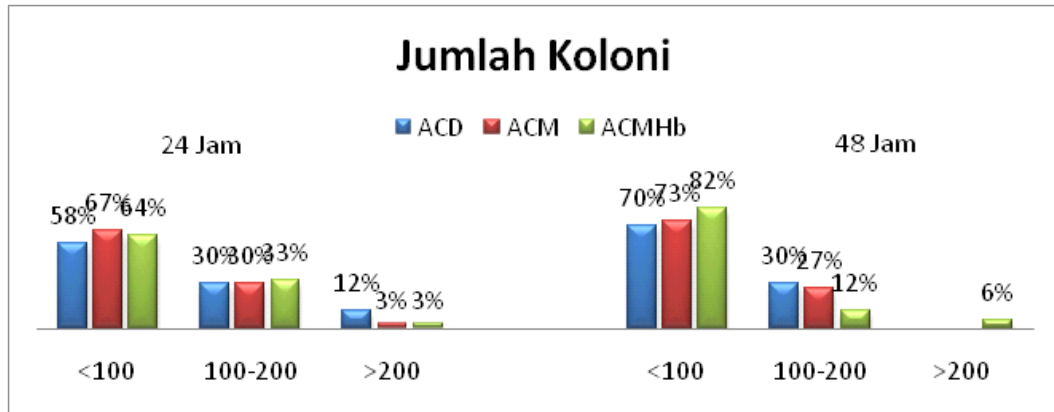
Tabel 1. Nilai P pada uji beda diameter koloni (post hoc LSD)

Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa pada inkubasi 24 jam rerata diameter koloni pada ACMHb ($0,96 \pm 0,22$ mm) lebih kecil dan signifikan ($p = 0,000$) dibandingkan rerata diameter koloni pada ACD ($1,42 \pm 0,42$ mm), tetapi lebih besar dibandingkan rerata diameter koloni pada ACM ($0,93 \pm 0,29$ mm), walaupun secara statistik tidak ada perbedaan bermakna di antara keduanya ($p = 0,491$). Pada inkubasi 48 jam rerata diameter koloni pada ACMHb bertambah besar dibandingkan pada inkubasi 24 jam, menjadi $1,77 \pm 0,4$ mm. Rerata diameter koloni pada ACMHb pada inkubasi 48 jam lebih kecil dan secara statistic signifikan ($p = 0,036$) dari rerata diameter koloni pada ACD ($1,97 \pm 0,44$ mm) , namun lebih besar dibandingkan pada ACM ($1,64 \pm 0,27$ mm), walaupun secara statistic tidak signifikan ($p = 0,194$).



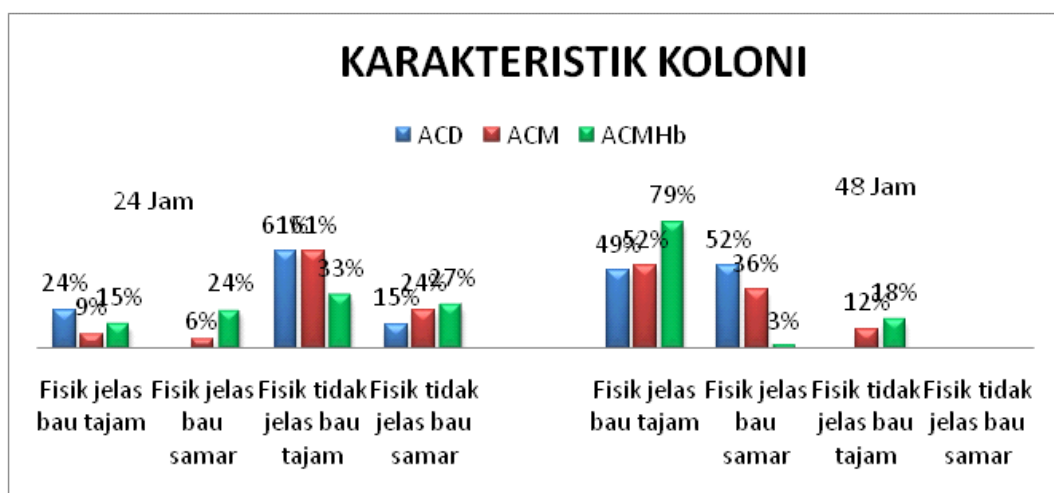
Gambar 1. Perbandingan penampakan koloni *H. influenzae* yang tumbuh pada media ACD, ACM, dan ACMHb pada masa inkubasi 24 jam.

Jumlah koloni dan karakteristik koloni grafiknya dapat dilihat pada grafik berikut:



Grafik 3. Jumlah koloni *H. influenzae* pada inkubasi 24 jam dan 48 jam

Dari grafik terlihat bahwa jumlah koloni pada inkubasi 24 dan 48 jam, pada pengamatan di laboratorium untuk semua jenis media tidak jauh berbeda. Kemudian data jumlah koloni diolah menggunakan uji Kolmogorov-smirnov karena terdapat 33% data memiliki *expected count* kurang dari 5. Hasil uji Kolmogorov-smirnov menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna jumlah koloni pada ketiga media ($p \geq 0,05$).

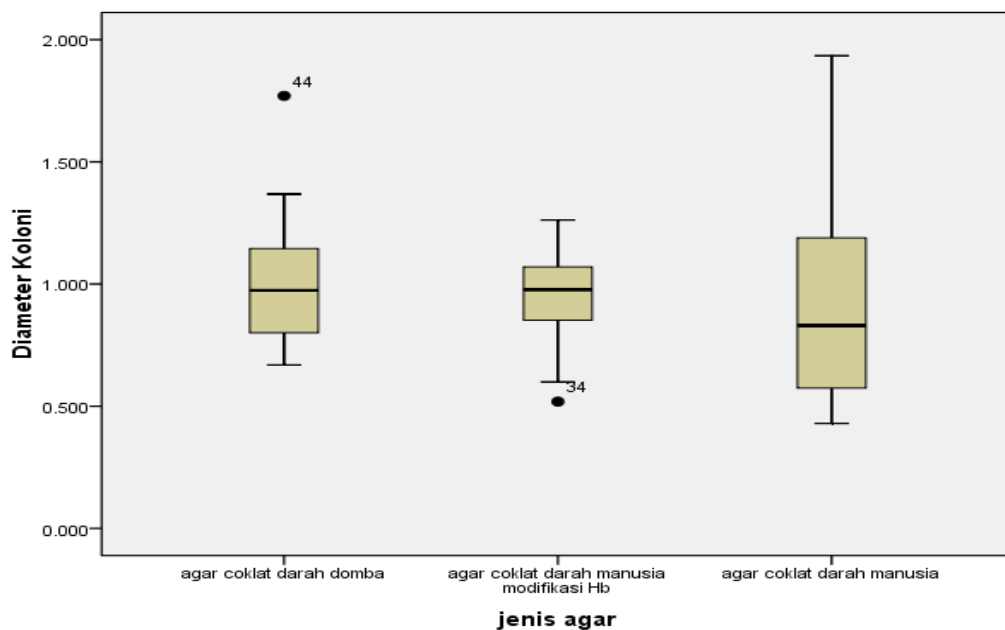


Grafik 4. Karakteristik koloni *H. influenzae* pada inkubasi 24 jam dan 48 jam

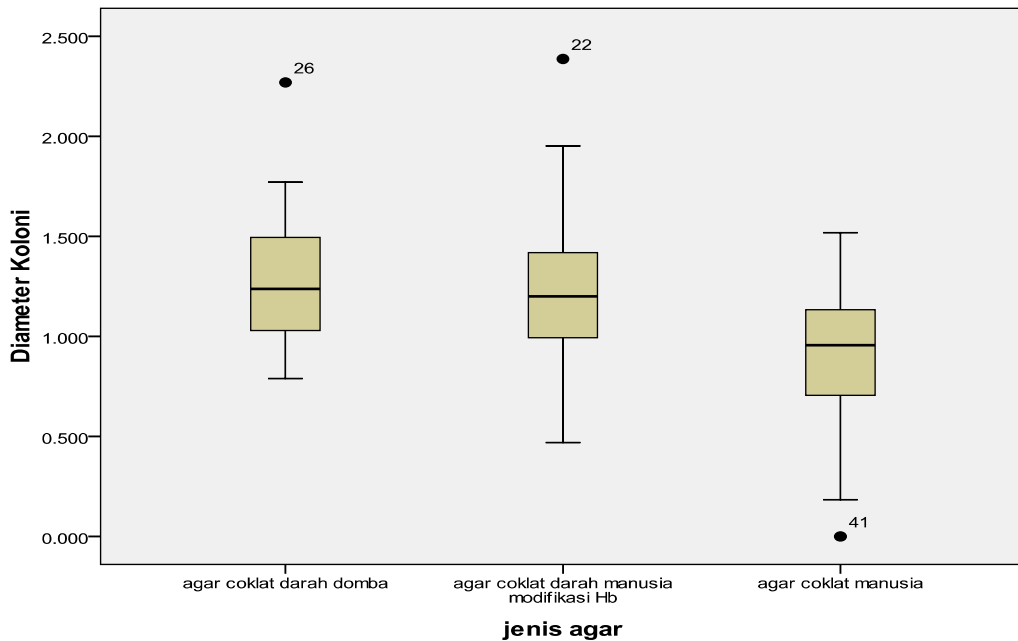
Dari grafik di atas terlihat bahwa sebagian besar koloni *H. influenzae* dapat tumbuh dengan karakteristik fisik yang sesuai dan bau yang khas. Yang dimaksud dengan fisik positif (+) adalah morfologi dari koloni *Haemophilus influenzae* yang tampak kehijauan atau keabu-abuan atau berkilau transparan seperti tetes air, pada inkubasi 24 jam koloni masih tampak transparan dan berkilau pada semua media dan seluruh strain.

Pada penelitian isolat *spike* ke dalam sputum, *H. influenzae* di-*spike* ke dalam sputum pasien penderita infeksi saluran nafas bawah yang bukan disebabkan oleh *H. influenzae*, untuk melihat pertumbuhan *H. influenzae* jika ditanam bersama bakteri lain seperti bakteri gram (-) dan *Staphylococcus*.

Pertumbuhan *H.influenzae* yang diamati adalah diameter koloni dan karakteristik koloni (bisa dibedakan dengan koloni lain atau tidak.) Diameter koloni dari ketiga media pada pengamatan 24 dan 48 jam dapat dilihat dalam grafik 5 dan 6 :



Grafik 5. Grafik diameter koloni setelah inkubasi 24 jam. Nilai $p = 0,461$ (one way ANOVA)

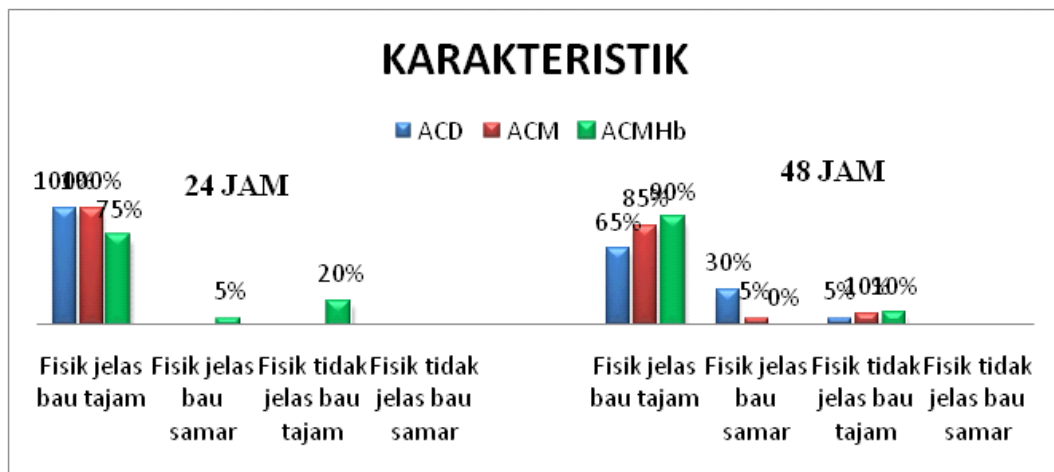


Grafik 6. Diameter koloni setelah inkubasi 48 jam. Nilai $p = 0,004$ (one way anova)

Pertumbuhan *H. influenzae* pada suspensi yang di-*spike* ke dalam sputum lebih kecil dibandingkan pertumbuhannya pada suspensi murni (tabel 2). Pada pengamatan 24 jam, pertumbuhan *H. influenzae* pada ACMHb ($0,96 \pm 0,2$ mm) lebih besar dibandingkan pada ACM ($0,89 \pm 0,4$ mm), namun uji post hoc LSD tidak menunjukkan hal yang signifikan ($p = 0,524$), namun lebih kecil dibandingkan pada ACD ($1,01 \pm 0,27$ mm) walaupun tidak signifikan ($p= 0,543$).

Pada pengamatan 48 jam, rerata diameter koloni pada ACMHb ($1,23 \pm 0,45$ mm) jauh lebih besar dibandingkan pada ACM ($0,88 \pm 0,37$ mm) dengan nilai $p = 0,002$. Walaupun sedikit lebih kecil dibandingkan pada ACD ($1,29 \pm 0,37$ mm), uji posthoc LSD menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna di antara keduanya ($p = 0,64$)

Frekuensi karakteristik koloni *H. influenza* yang di-*spike* ke dalam sputum dapat dilihat pada grafik berikut :



Grafik 7. Karakteristik koloni 24 jam dan 48 jam (uji kolmogorov smirnov)

Dari grafik dapat dilihat tidak ada perbedaan karakteristik pada ketiga media baik masa inkubasi 24 jam maupun 48 jam, sebagian besar koloni *H. influenzae* dapat tumbuh pada ketiga jenis media dan dapat diidentifikasi karakteristik fisiknya sehingga mudah dibedakan dengan bakteri lain yang juga tumbuh pada media. Bau khas koloni *H. influenzae* masih tetap muncul walaupun tidak sekuat apabila ditanam dari suspensi murni. Pada inkubasi 24 jam dan 48 jam, *H. influenzae* yang ditumbuhkan pada ACD, ACM serta ACMHb menunjukkan karakteristik yang tidak berbeda bermakna secara statistik.

PEMBAHASAN

Kuman *H. influenzae* yang ditanam pada ACD, ACM, dan ACMHb diamati setelah inkubasi selama 24 dan 48 jam. Ketiga media dapat menumbuhkan *H. influenzae* dengan baik dan tetap mempertahankan karakter aslinya yaitu koloni bulat, keabu-abuan atau kehijauan, dengan bau khas *mousy odor*. Hasil pengamatan pada diameter koloni (grafik 1 dan 2) menunjukkan pertumbuhan *H. influenzae* dari suspensi murni pada media ACMHb lebih baik dibandingkan dengan pertumbuhannya di ACM, namun belum sebaik pertumbuhannya pada

media ACD. Adapun dilihat dari segi jumlah koloni (grafik 3) dan karakteristik *H. influenzae* (grafik 4) yang ditumbuhkan pada ketiga media menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa darah manusia tidak mengandung zat-zat yang dapat menghambat pertumbuhan *Haemophilus influenzae*.

Perbedaan membran eritrosit darah domba dan manusia mempengaruhi pertumbuhan *H. influenzae*. Darah domba lebih mudah untuk hemolisis dibanding darah manusia karena darah manusia telah mengalami perubahan membran eritrosit yang disebut sebagai ekinosit karena stress oksidatif pada protein dan lipid membran, turunnya pH, hilangnya ATP dan 2,3 DPG, serta meningkatnya kadar kalium dalam sel sehingga menyebabkan pompa ATP $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase tidak berfungsi. Bentuk ekinosit inilah yang menyebabkan darah manusia lebih sulit untuk lisis.

Dalam penelitian ini, kadar hemoglobin darah manusia ditingkatkan agar suplai faktor X dapat bertambah. Peningkatan Hb dimaksudkan supaya lebih banyak tersedia Hb yang merupakan substrat dari faktor X. Darah manusia yang digunakan pada ACM memiliki kadar Hb 13.8 ± 1.1 g/dl, sedangkan untuk ACMHb menggunakan *packed Red Cell* yang didapat dari Bank Darah Laboratorium Sentral RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan kadar Hb 17.4 ± 1.2 g/dl.

Tingginya kadar hemoglobin pada *packed red cell*, diharapkan pada saat eritrosit lisis akibat pemanasan saat pembuatan agar coklat, lebih banyak faktor X (hemin) yang dilepaskan. Hal ini menyebabkan lebih banyak nutrisi yang

terkandung di dalam agar coklat, sehingga pertumbuhan *H. influenza* lebih optimal sebaik pertumbuhannya di agar coklat dari darah domba.

Penelitian ini membuktikan bahwa penambahan kadar hemoglobin pada ACMHb menunjukkan pertumbuhan isolat murni *H.influenzae* yang lebih baik dari segi rerata diameter koloni *H.influenza* jika dibandingkan pada ACM, walaupun belum sebaik pertumbuhannya pada ACD

Perbandingan ACD, ACM, dan ACMHb Dalam Menumbuhkan *Haemophilus influenza* Pada Suspensi yang di-spike ke dalam Sputum

Dalam penelitian ini dilakukan *spike* ke dalam sputum. Sputum digunakan karena merupakan media yang relevan untuk *Haemophilus influenzae* sebagai bakteri pathogen sistem pernafasan. Selain itu, banyak bakteri yang terkandung dalam sputum, sehingga dapat menilai kemampuan *H.influenza* untuk hidup jika berkompetisi dengan bakteri lain pada ketiga media. Berdasarkan pada tabel 2 didapatkan penurunan rerata diameter koloni pada ketiga media jika dibandingkan pertumbuhan *H.influenza* pada isolat murni, tetapi pada grafik 7 dapat dilihat karakteristik koloni *H.influenza* yang di-*spike* ke dalam sputum tetap tampak dengan cukup jelas pada ketiga media sehingga dapat dibedakan dengan koloni bakteri lain. Pada grafik 5 dan 6 dapat dilihat pertumbuhan *H. influenzae* pada suspensi yang di-*spike* ke dalam sputum menunjukkan hasil yang sama baik pada rerata diameter koloni antara ACD dan ACMHb. Rerata diameter koloni pada ACMHb juga lebih baik dibandingkan pada ACM.

Sputum mengandung berbagai jenis bakteri, seperti *Mycobacterium sp* dan *Streptococcus sp*. Selain itu sputum juga mengandung berbagai komponen

bakterisid seperti leukosit, makrofag, dan SLPI. SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) adalah sejenis zat yang dihasilkan membrana mukosa saluran pernapasan untuk mencegah imun tubuh merusak jaringan tubuh sendiri jika terjadi infeksi. SLPI juga mengandung zat bakterisid dan juga fungisidal. Adanya zat – zat bakterisid, seperti leukosit, makrofag, dan SLPI serta ketersediaan nutrisi dalam *plate* yang terbatas menjadi penyebab kecilnya rerata diameter koloni *H. influenzae* bila dibandingkan dengan kulturnya dari suspensi murni.

Dengan demikian, ACMHb dapat digunakan sebagai media alternatif pertumbuhan *Haemophilus influenzae* dengan masa inkubasi 48 jam. Hal ini sesuai dengan penelitian- penelitian sebelumnya yang juga melakukan perhitungan diameter koloni pada masa inkubasi 48 jam.