



**PENCUCIAN ERITROSIT DARAH MANUSIA  
UNTUK MENGOPTIMALKAN PERTUMBUHAN *Haemophilus influenzae*  
PADA MEDIA AGAR COKLAT DARI DARAH MANUSIA**

THE WASHING OF HUMAN BLOOD ERYTHROCYTES  
FOR OPTIMIZING THE GROWTH OF *Haemophilus influenzae*  
IN CHOCOLATE AGAR MEDIA MADE FROM HUMAN BLOOD

**ARTIKEL ILMIAH**

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

**THEOFILUS ARDY PRADHANA**

**G2A007171**

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

**PENCUCIAN ERITROSIT DARAH MANUSIA  
UNTUK MENGOPTIMALKAN PERTUMBUHAN *Haemophilus influenzae*  
PADA MEDIA AGAR COKLAT DARI DARAH MANUSIA**

Theofilus Ardy<sup>1</sup>, Helmia Farida<sup>2</sup>

**ABSTRAK**

**Latar belakang** : Agar Coklat Darah Domba (ACD) adalah media standar untuk pemeriksaan mikrobiologi beberapa bakteri fastidious, termasuk *H. influenzae*. Pada banyak negara berkembang pengadaan ACD cukup sulit sehingga digunakan Agar Coklat Darah Manusia (ACM) sebagai alternatif walaupun dengan performa tidak sebaik ACD standar. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan cara memodifikasi ACM supaya media tersebut memiliki kemampuan mengkultur sebaik atau bahkan lebih baik dari ACD.

**Metode** : Penelitian ini menggunakan desain True-Experimental Post Test Only terhadap 11 strain *H. influenzae*. Suspensi kuman diencerkan dengan perbandingan 1:5000 dengan densitas 0,5 McF. Seluruh strain ditanam pada tiga jenis plate agar secara triplo dengan dua cara, yang pertama adalah dengan diinokulasikan dalam bentuk suspensi murni, ditanam dalam ACD, ACM dan ACM-cuci, untuk dinilai jumlah, diameter dan karakteristik koloni. Adapun cara yang kedua adalah suspensi *H. influenzae* dispike dengan sputum kemudian ditanam pada ketiga media diatas (dinilai diameter dan karakteristik koloni). Data yang diperoleh dideskripsikan dalam bentuk grafik, dianalisis dengan uji Chi-square atau Kolmogorov-Smirnov untuk data jumlah dan karakteristik koloni, uji Anova untuk diameter koloni, dan diolah dengan komputer.

**Hasil** : Diameter koloni suspensi murni *H. influenzae* yang ditanam pada ACD, setelah inkubasi 24 jam menunjukkan hasil yang lebih besar bila dibandingkan dengan ACM dan ACM-cuci (masing-masing  $p=0,000$ ). Pada inkubasi 48 jam diameter ACM-cuci sama besar dengan ACD dan lebih besar dari ACM. Jumlah dan karakteristik koloni kuman dari suspensi murni *H. influenzae* tidak menunjukkan perbedaan yang berbeda bermakna pada suspensi kuman yang ditanam pada semua jenis agar. Pada penanaman suspensi *H. influenzae* spike sputum pada ketiga media didapatkan diameter koloni inkubasi 24 dan 48 jam pada ACM-cuci lebih besar bila dibandingkan dengan ACD dan ACM, juga bermakna secara statistik.

**Kesimpulan** : ACM standar tanpa modifikasi tidak dianjurkan untuk kultur *H. influenzae*, sedangkan ACM-cuci direkomendasikan sebagai media pengganti ACD yang cukup baik.

**Kata Kunci** : *Haemophilus influenzae*, kultur, pencucian, darah manusia

**THE WASHING OF HUMAN BLOOD ERYTHROCYTES  
FOR OPTIMIZING THE GROWTH OF *Haemophilus influenzae*  
IN CHOCOLATE AGAR MEDIA MADE FROM HUMAN BLOOD**

**ABSTRACT**

**Background:** Sheep Blood Chocolate Agar (SCA) is the standard media for microbiological examination of some fastidious bacteria, including *H. influenzae*. In many developing countries, the preparation of SBCA is quite difficult, so Human Blood Chocolate Agar (HCA) is used for alternative media although its performance is not as well as the standard SCA. This study aims to find ways to modify the HCA so that it has the culture performance as well or better than the SCA.

**Methods:** This research uses a True-Experimental Post Test Only design in 11 strains of *H. influenzae*. Bacteria suspension was diluted with a ratio 1:5000 with 0.5 McF density. The whole strains were grown on three types of agar plate in triplo in two ways, first its inoculated in a pure suspension, grown in SCA, HCA and HCA-washed, to assess the colony count, colony diameter and colony characteristics. The second way is spiking the pure suspension into a sputum then it was inoculated in three media (For the sputum spiked suspension, the colony count was not observed). The obtained data were described in graphics, analyzed by Chi-square or Kolmogorov-Smirnov test for the colony count and colony characteristics data, Anova test for colony diameter data, and processed by computer.

**Result :** The colony diameter of *H. influenzae* pure suspension grown in the SCA, after 24 h incubation showed greater results when compared with HCA and HCA-washed (respectively  $p = 0.000$ ). At 48 h incubation, the diameter of HCA-washed was as big as SCA and bigger than HCA. The number and characteristics of bacteria colonies from pure suspensions of *H. influenzae* did not show significant differences in all types of order media. At *H. influenzae* sputum spike suspension plant on all three media, obtained the colony diameter of 24 and 48 h incubation at HCA-washed is greater when compared with SCA and HCA, and also statistically significant.

**Conclusion:** HCA standard without modification is not recommended for culturing *H. influenzae*, whereas HCA-washed is recommended as a replacement media SCA.

**Keywords:** *Haemophilus influenzae*, culture, washing, human blood

## PENDAHULUAN

*Haemophilus influenzae* adalah mikroorganisme yang merupakan penyebab penting dari meningitis pada anak-anak dan kadangkala menyebabkan infeksi saluran pernapasan pada anak-anak dan orang dewasa<sup>1</sup>. Bakteri ini dapat digolongkan sebagai bakteri *fastidious* karena membutuhkan media dan cara kultur yang cukup kompleks untuk dapat menumbuhkannya. Media tersebut adalah media agar coklat yang mengandung hemin (faktor X) dan NAD (faktor V) serta inkubasi pada suhu 35°C dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5,5%<sup>2</sup>.

Pada umumnya media agar coklat dibuat dari darah kuda atau domba karena banyak ditemukan faktor-faktor pertumbuhan tersebut di atas dalam darah kuda atau domba. Selain itu, di dalam darah kuda atau domba tidak didapati adanya komplemen dan antibodi yang dapat menghambat pertumbuhan *H. influenzae* seperti pada darah manusia<sup>3</sup>.

Di Negara-negara berkembang, penggunaan darah manusia sebagai bahan baku pembuatan agar coklat darah masih sangat banyak digunakan karena keterbatasan masalah dana dan sumber daya bila harus menggunakan darah kuda atau domba. Hal tersebut tentu berakibat pada hasil kultur yang kurang memuaskan dalam menumbuhkan *H. influenzae*<sup>4</sup>.

Salah satu intervensi yang akan diteliti adalah bagaimana meminimalisir atau bahkan menghilangkan komplemen dan antibodi yang terkandung dalam darah manusia. Diketahui bahwa komplemen bersifat *heat-labile* yang inaktif pada suhu 56°C namun antibodi adalah senyawa yang bersifat *heat-stable* yang baru bisa dieliminasi pada suhu di atas 90°C<sup>5,6</sup>. Proses pencucian adalah intervensi yang paling ideal karena dapat mengeliminasi komplemen serta antibodi yang bersifat *heat-stable*, tanpa merusak substrat penting lainnya<sup>7</sup>. Setelah proses pencucian yang intensif dan berulang akan didapatkan darah manusia yang tidak mengandung antibodi dan komplemen yang merupakan faktor penghambat pertumbuhan *H. Influenzae* sehingga darah manusia siap diolah lebih lanjut dalam pembuatan media

kultur bakteri tersebut dengan harapan hasil yang sama baik dengan penggunaan darah domba.

## **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 pencucian lebih intensif. 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 *dispike* 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.

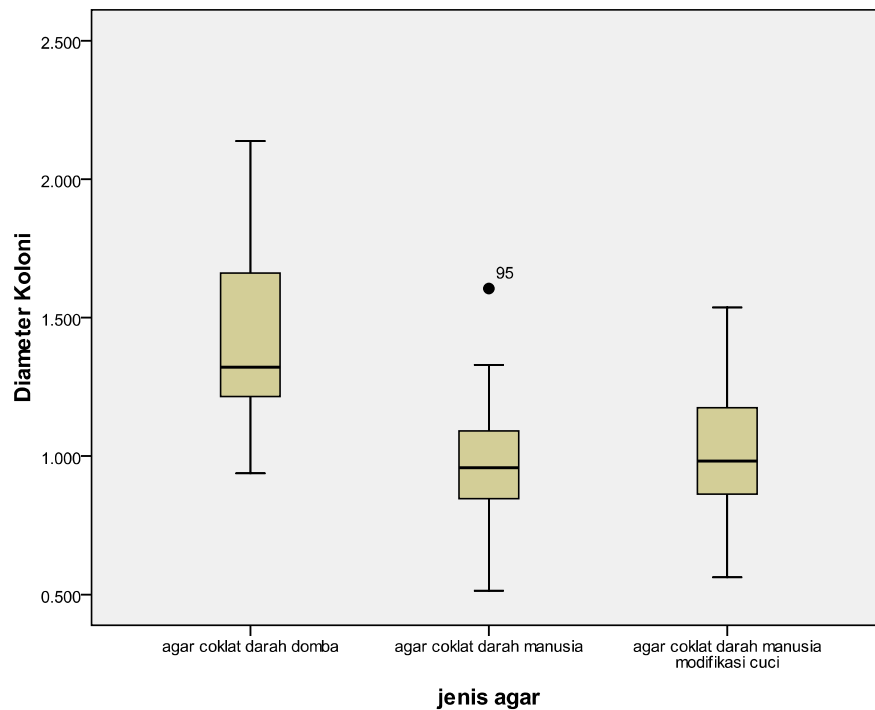
Suspensi kuman *H. influenzae* dengan densitas kuman 0,5 Mac Farland diencerkan dengan NaCl fisiologis hingga 1:5000 kemudian dilakukan *streak* penuh pada ketiga media. Suspensi kuman 0,5 Mac Farland yang telah diencerkan tersebut juga dicampur dengan sputum pasien pneumonia yang bukan disebabkan oleh *H. influenzae* kemudian dibuat homogen dengan vortex. Suspensi kuman yang *dispike* 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.

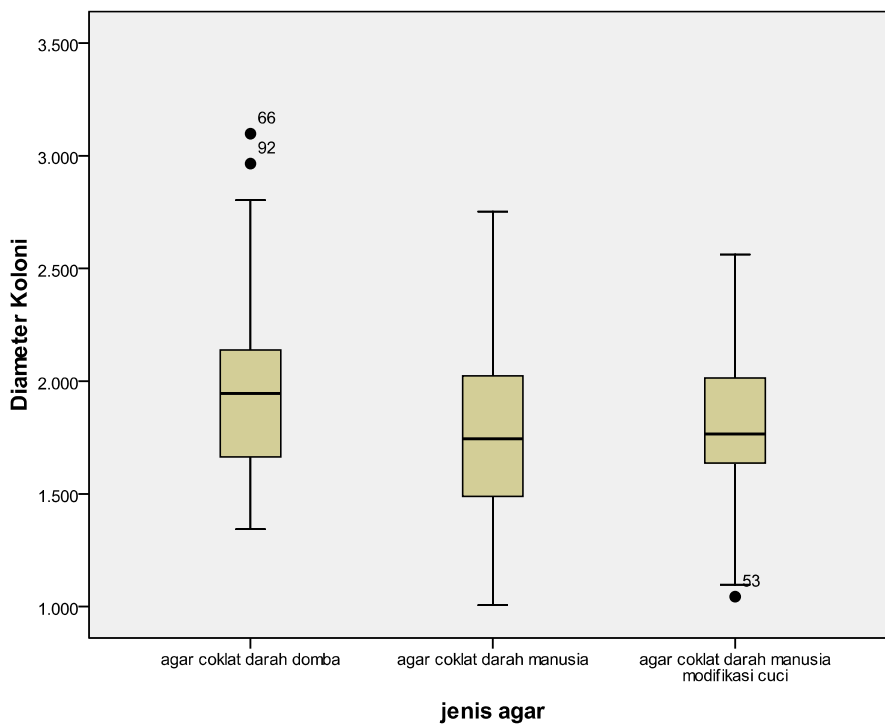
Diameter koloni merupakan skala numerik yang diuji menggunakan one way Anova atau Kruskal Wallis. Jumlah koloni dan karakteristik berupa skala nominal/ordinal yang diuji menggunakan chi-square atau Kolmogorov-smirnov sebagai alternatif. Normalitas sebaran data diuji dengan Shapiro Wilk.

## HASIL PENELITIAN

Penilaian pertumbuhan *H.influenzae* pada penelitian ini dilihat dari jumlah koloni yang tumbuh dari suspensi murni *H.influenzae* 0,5 MacFarland, diameter koloni dan karakteristik koloninya.



Grafik 1. Diameter koloni inkubasi 24 jam ( $p=0,000$ ; uji one-way Anova)



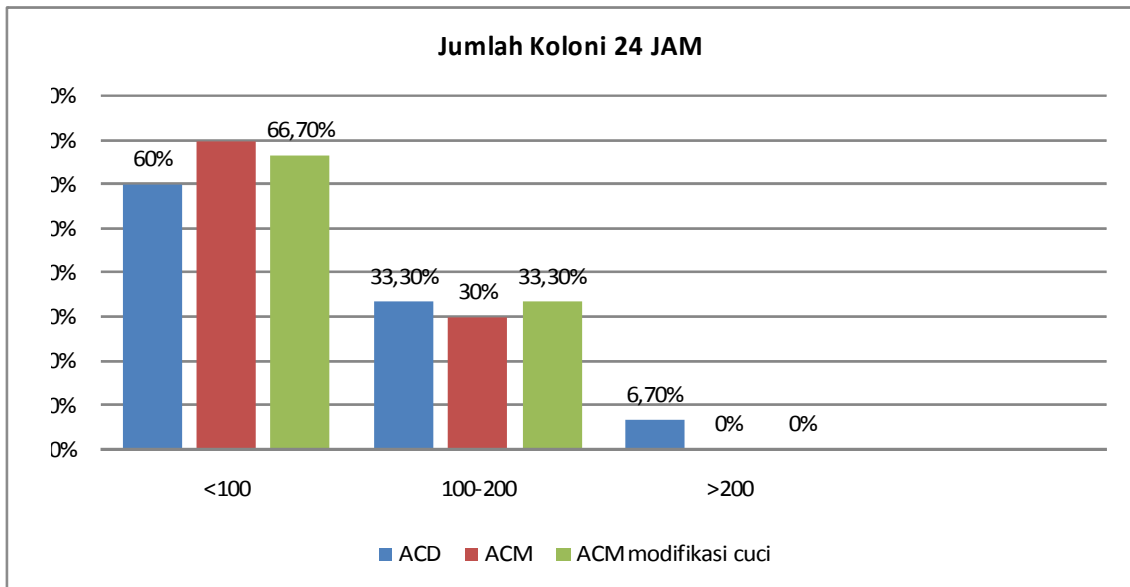
Grafik 2. Diameter koloni inkubasi 48 jam ( $p=0,111$ ; uji one-way Anova)

Dari grafik 1 dan 2 di atas, dapat dilihat bahwa pada inkubasi 24 jam koloni pada ACD memiliki diameter yang lebih besar daripada ACM dan ACM-cuci dan secara statistik bermakna, dengan nilai  $p=0,000$  untuk kedua jenis agar tersebut. Adapun diameter koloni pada ACM-cuci, seperti tercantum dalam grafik 1 dan tabel 1, lebih besar daripada ACM namun tidak bermakna secara statistik ( $p=0,566$ ).

Pada inkubasi 48 jam koloni yang tumbuh pada ACM-cuci menjadi lebih besar sehingga menghasilkan perbedaan yang tidak bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan ACD ( $p=0,121$ ). Koloni pada ACM, baik pada inkubasi 24 jam maupun 48 jam, tidak memiliki perbedaan signifikan dengan ACM-cuci ( $p=0,508$  dan  $0,647$ ).

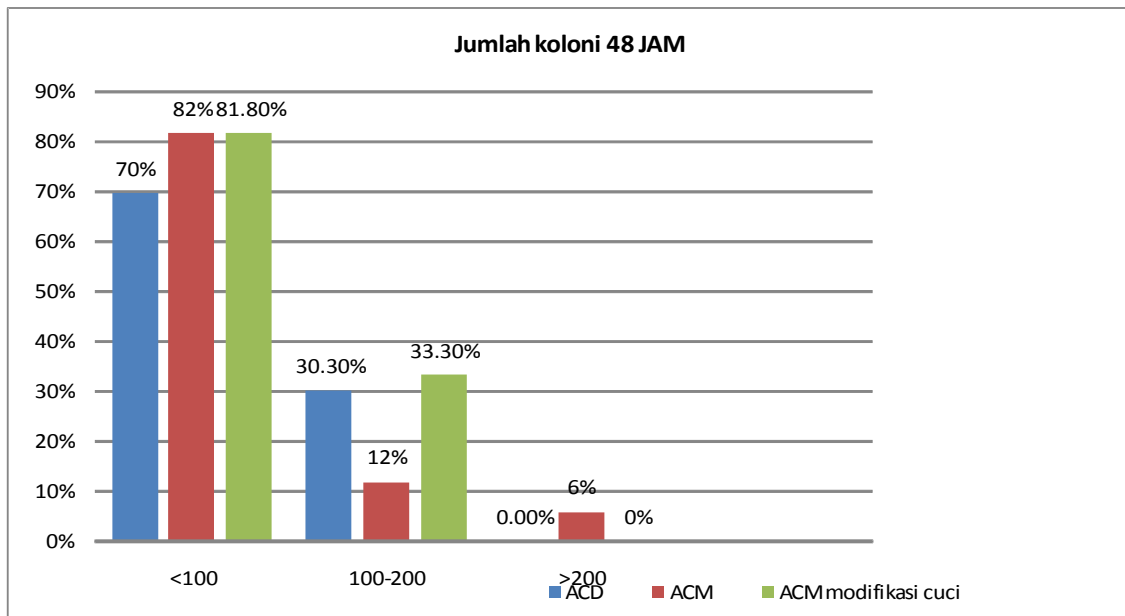
Media Kultur	Rata-rata Diameter dalam mm (inkubasi 24 jam)		Rata-rata Diameter dalam mm (inkubasi 48 jam)	
	Suspensi murni	Suspensi <i>spike</i> sputum	Suspensi murni	Suspensi <i>spike</i> sputum
ACD	1,47	1,01	1,96	1,29
ACM	0,96	0,96	1,77	1,23
ACM-cuci	1,01	1,27	1,81	1,61

Tabel 1. Perbandingan diameter koloni pada ketiga jenis media



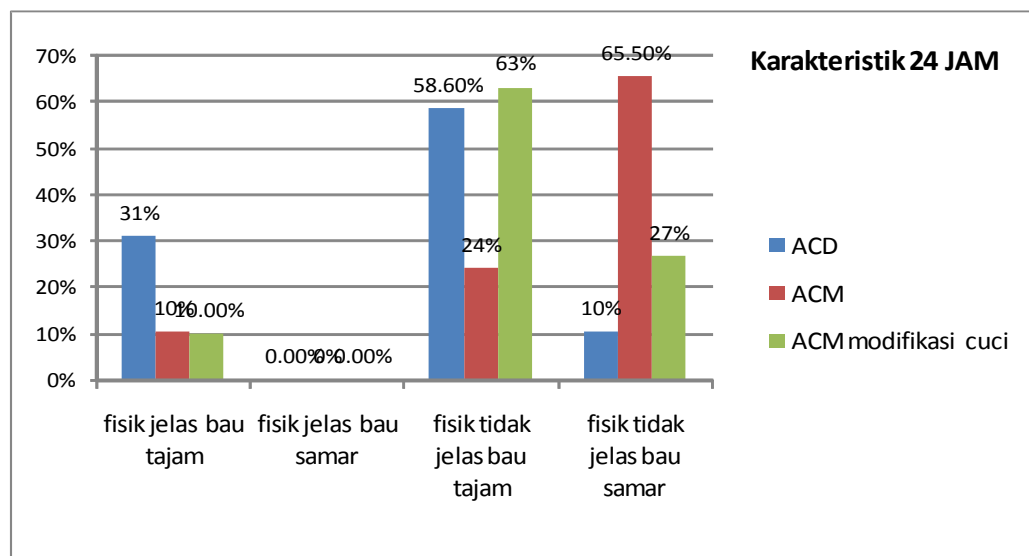
Grafik 3. Perbandingan presentase jumlah koloni inkubasi 24 jam



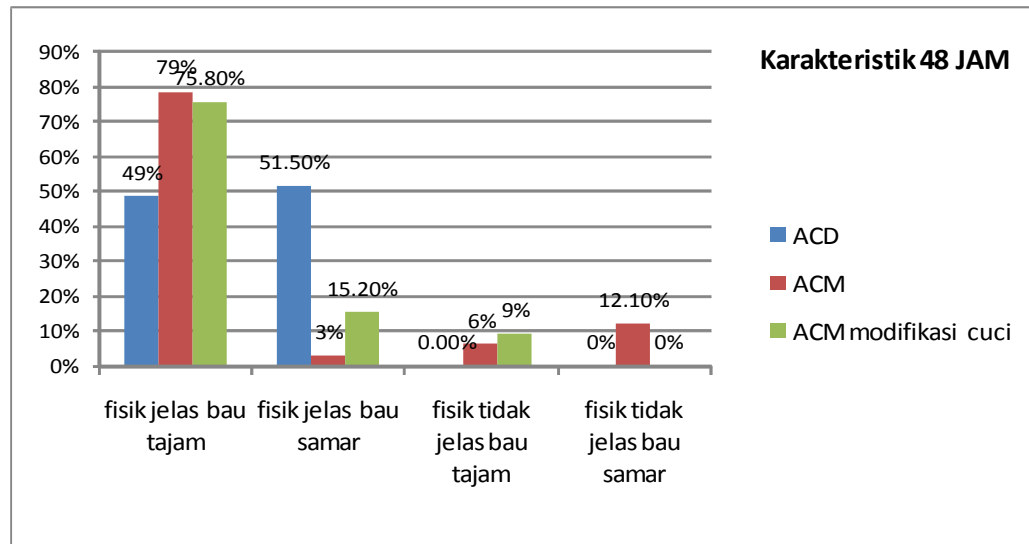


Grafik 4. Perbandingan presentase jumlah koloni inkubasi 48 jam

Dari grafik 3 dan 4 dapat dilihat bahwa jumlah koloni yang tumbuh pada ACD, ACM dan ACM-cuci pada kultur 24 jam ( $p=0,366$ ) dan 48 jam ( $p=0,125$ ) tidak jauh berbeda dan secara statistik menunjukkan perbedaan tidak bermakna setelah diuji menggunakan chi-square.



Grafik 5. Perbandingan karakteristik koloni inkubasi 24 jam



Grafik 6. Perbandingan karakteristik koloni inkubasi 48 jam

Dari grafik 5 dan 6 dapat dilihat bahwa karakteristik pada inkubasi 24 jam, ACD dan ACM-cuci secara statistik tidak berbeda bermakna ( $p = 0,532$ ) begitu pula pada inkubasi 48 jam ( $p = 0,172$ ). Adapun karakteristik koloni ACM berbeda bermakna bila dibandingkan dengan koloni pada ACD dan ACM-cuci ( $p=0,000$  dan  $0,023$ ), yaitu koloni ACM lebih banyak yang memiliki fisik tidak jelas dan bau khas yang masih samar-samar. Pada inkubasi 48 jam koloni pada ACM telah tumbuh lebih baik sehingga tidak lagi menunjukkan perbedaan karakteristik yang bermakna ( $p=0,097$ ).

Yang dimaksud dengan fisik positif (+) dalam penelitian ini adalah morfologi dari koloni *H.influenzae* yang tampak kehijauan atau keabu-abuan, atau tampak transparan dan berkilau pada semua media dan seluruh strain. █

## PEMBAHASAN

Jumlah dan karakteristik kuman didapati tidak mengalami perbedaan yang signifikan antara ketiga jenis media yang digunakan, baik dalam inkubasi 24 maupun 48 jam. Kedua indikator tersebut dinilai untuk mengetahui apakah *H.influenzae*

benar-benar dapat tumbuh dengan baik dan tetap terjaga karakteristiknya. Senada dengan penelitian yang dilakukan oleh Mike Gratten *et al* yang menilai densitas koloni dalam plate agar coklat untuk membandingkan agar coklat yang berbahan baku darah domba dengan darah kuda<sup>8</sup>. Ditemukan jumlah yang hampir sama antara kedua jenis coklat agar tersebut. Karakteristik yang ditemui pun menunjukkan hasil yang sama, yakni karakteristik koloni yang bulat, berwarna abu-abu kehijauan dan berbau khas *mousy odor*.

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa diameter koloni inkubasi 24 jam, koloni pada ACD berukuran lebih besar dan bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kedua media lainnya. Pada inkubasi selama 48 jam, diameter koloni telah mengalami perkembangan dan didapatkan diameter ACM-cuci sama besar dengan diameter pada ACD. Inkubasi 48 jam merupakan waktu pengamatan yang paling optimum untuk *H.influenzae*. Penelitian yang dilakukan Chandar Anand *et al* juga menggunakan waktu pengamatan setelah inkubasi 48 jam<sup>9</sup>.

Menurut penelitian yang dilakukan River *et al*, baik darah domba maupun darah manusia mengandung faktor inhibisi pertumbuhan *H.influenzae* yang disebut NADase. Pemanasan yang dilakukan dalam persiapan pembuatan media dapat merusak faktor ini sehingga darah domba mengandung lebih sedikit NADase<sup>10</sup>.

Media ACM-cuci dapat menyamai performa tumbuh seperti pada ACD karena pencucian empat kali yang dilakukan mampu mengeliminasi sebagian besar protein yang terkandung dalam plasma, seperti immunoglobulin A, G, M dan komplemen C3<sup>11</sup>. Hilangnya antibodi dan komplemen ini berarti hilangnya komponen yang menghambat pertumbuhan *H.influenzae* pada ACM-cuci sehingga koloni dapat tumbuh lebih baik.

Penelitian ini selain mengamati pertumbuhan koloni *H.influenzae* yang ditanam strain murninya, dilakukan juga penanaman suspensi kuman yang dispike ke dalam sputum. Tujuan penanaman dengan dispike ini adalah mengetahui apakah *H.influenzae* masih dapat dibedakan dengan bakteri-bakteri lain yang ada di dalam sputum yang merupakan spesimen yang relevan dengan penyakit yang ditimbulkan

*H.influenzae* sehingga menyerupai pemeriksaan kultur untuk menegakkan diagnosis pasien. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Saha et al menggunakan LCS sebagai bahan spike-nya. Pemilihan LCS sebagai media spike juga cukup relevan dengan penyakit yang ditimbulkan oleh *H.influenzae* tetapi LCS bersifat steril (tidak mengandung bakteri lain) dan sangat minim kandungan antibodi. Pemilihan sputum sebagai media spike lebih baik untuk menguji kemampuan media menumbuhkan *H.influenzae* dengan tetap mempertahankan karakteristiknya sehingga mudah dibedakan dari kuman kontaminan lainnya.

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa diameter koloni *H.influenzae* yang dispike sputum pada ACM-cuci menunjukkan hasil yang lebih besar dari yang tumbuh pada kedua media lain. Koloni bakteri ini pun masih dapat dibedakan dengan jelas karena karakteristiknya masih terjaga, yakni koloni bulat berwarna abu-abu kehijauan yang berbau *mousy odor*.

Keberadaan bakteri-bakteri dalam sputum membuat koloni *H.influenzae* tampak lebih kecil bila dibandingkan dengan pertumbuhannya pada suspensi murni. Hal ini dikarenakan sputum yang di dalamnya terdapat neutrofil, makrofag, eosinofil, limfosit, dan lain-lain ini juga dapat ditemukan bakteri seperti *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, dan *Streptococcus pneumoniae*. Pada sputum juga ditemui lebih banyak antiboditerhadap *H.influenzae*, seperti SLPI yang mempunyai efek bakterisidal, sehingga menyebabkan pertumbuhan pada spike sputum tidak sebaik pada suspensi murni. Bagaimanapun, darah yang telah dimodifikasi dengan dicuci menunjukkan performa sama baik dengan media standarnya.

## **SARAN**

ACM-cuci dapat digunakan sebagai media alternatif untuk kultur *H.influenzae* karena lebih terjangkau dari segi pengadaan dibandingkan dengan ACD, terutama untuk isolasi primer (kultur spike sputum) karena performanya yang bahkan lebih baik dari ACD. Kultur *H. influenzae* diharapkan dapat menjadi kultur rutin untuk

pasien suspek meningitis atau pneumonia terutama pada pasien bayi dan anak-anak mengingat kuman ini merupakan patogen penting.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Pada kesempatan ini, ingin penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan kepada :

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar, meningkatkan ilmu pengetahuan dan keahlian.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan keahlian.
3. dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp.A selaku Dosen Pembimbing Karya tulis yang telah memberikan kesempatan, meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing penulis hingga dapat menyelesaikan penulisan karya tulis ini, dan senantiasa memberikan semangat serta ide-ide demi kesempurnaan penulisan artikel ilmiah ini
4. dr. Endang Sri Lestari, Ph.D selaku ketua penguji pada seminar karya tulis ilmiah ini yang telah memberikan saran dan kritiknya sehingga penulis dapat menyelesaikan artikel ilmiah ini dengan baik.
5. dr. Purnomo Hadi, M.Si selaku penguji pada seminar karya tulis ilmiah ini yang telah memberikan saran dan kritiknya sehingga penulis dapat menyelesaikan artikel ilmiah ini dengan baik.
6. Seluruh keluarga serta kekasih tercita yang selalu memberikan doa dan dukungan sehingga karya ilmiah ini dapat berjalan lancar.
7. Nila Maharani dan Risang Bagaskoro serta semua teman-teman yang telah yang telah membantu selama dalam penelitian ini sehingga karya tulis ilmiah ini dapat selesai.
8. Semua pihak yang telah membantu yang tidak mungkin disebut satu persatu

## DAFTAR PUSTAKA

1. Geo F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Salemba Medika. hal : 395-9
2. Kuhnert P; Christensen H (editors). *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Caister Academic Press;2008
3. *Generic protocol for population-based surveillance of Haemophilus influenzae type B*. World Health Organization;1997.WHO/VRD/GEN/95.05
4. Winn W, Stephen A, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Edisi ke-6. Baltimore , Lipincott William and Wilkins 2006 : 444 – 50
5. Anderson P, Johnston RB, Smith DH. Human Serum Activities against *Hemophilus influenzae, Type b*. The Journal of Clinical Investigation 1972; 51 : 31-8
6. I Gusti Ayu Agung Suartini , I Wayan Teguh Wibawan, Maggy T. Suhartono, Supar, I Nyoman Suarta. *Aktivitas IgY dan IgG Antitetanus setelah Perlakuan pada Berbagai pH, Suhu dan Enzim Proteolitik*. Jurnal Veteriner Vol. 8 No. 4 : 160-166;2007
7. Jurnal Sains Kimia (Journal of Chemical Science) volume 7,nomor:2:44-50. Universitas Sumatera Utara ; 2003
8. Gratten M, Battistuta, Torzillo, Dixon, Manning. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of *Haemophilus influenza* and *Streptococcus pneumonia* from upper respiratory tract secretions. The Journal of Clinical Microbiology. Nov 1994; 2871-72
9. Chandar Anand, Rhonda Gordon, Helene Shaw, Kevin Fonseca, Merle Olsen. Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38(2): 591–594.

10. Elma Krumwiede And Ann G. Kuttner, M.D. *A Growth Inhibitory Substance For The Influenza Group Of Organisms In The Blood Of Various Animal Species The Use Of The Blood Of Various Animals As A Selective Medium For The Detection Of Hemolytic Streptococci In Throat Cultures.* Irvington House, Irvington-On-Hudson,;New York;1973
11. Sachs V, Dorner R, Rehder V. Washed erythrocyte concentrate. A contribution to the effect of the wash procedure and storage time on erythrocyte in the preparation of blood. Article in German Infusionstherapie. 1988 Dec;15(6):240-3. Available from: [www.ncbi.nlm.gov/pubmed/3235202](http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/3235202)