

KUALITAS MEDIA AGAR DARAH MANUSIA DAN DOMBA PADA PERTUMBUHAN *STREPTOCOCCUS B HEMOLYTICUS*

Quality of Human and Sheep Blood Agar Media on the Growth of Streptococcus B hemolytic

Mochamad Rizal Maulana¹

Maseva Wijayanti²

¹Poltekkes Kemenkes Semarang

²Universitas Airlangga Surabaya

*email:

mochamadrizalmaulana7@gmail.com

Abstrak

Agar darah domba (ADD) merupakan salah satu media pertumbuhan untuk mengidentifikasi bakteri patogen serta merupakan media standart untuk pemeriksaan mikrobiologi. Beberapa negara mengalami beberapa kesulitan dalam penggandaan ADD karena beberapa faktor, sehingga dibutuhkan alternatif lain yaitu penggunaan agar darah manusia (ADM) sebagai pengganti. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kelayakan ADM sebagai media alternatif pengganti ADD dalam menumbuhkan *Streptococcus Beta Hemolitycus*. Penelitian ini menggunakan media Agar Darah Domba dan Agar Darah Manusia yang selanjutnya diamati pada 24 dan 48 jam inkubasi yang akan terlihat perbedaan hemolisa dalam ukuran diameter. Hasil pada 24 jam, rerata diameter hemolisa ADM belum menunjukkan hemolisa (0,00mm) dan berbeda dengan ADD (0,40mm), Sedangkan pada 48 jam, rerata diameter hemolisa ADM belum menunjukkan hemolisa (0,52mm) dan berbeda dengan ADD (1,10mm). Berdasarkan hasil diatas, kedepannya perlu dilakukan pengontrolan terhadap variabel lain yang mungkin mempengaruhi seperti Hb dan usia eritrosit, ketebalan agar, pH yang digunakan, dan teknik menanam (strict) agar memperoleh hasil pertumbuhan yang lebih maksimal

Kata Kunci:

Streptococcus beta hemolyticus, ADM, ADD.

Keywords:

Streptococcus beta hemolyticus, ADM, ADD.

Abstract

Sheep blood agar (ADD) is a growth medium for identifying pathogenic bacteria and is a standard medium for microbiological examination. Some countries experience some difficulties in multiplying ADD due to several factors, so another alternative is needed, namely the use of human blood agar (ADM) as a substitute. This study aims to examine the feasibility of ADM as an alternative medium to replace ADD in growing *Streptococcus Beta Hemolitycus*. This study used sheep blood agar and human blood agar which were then observed at 24 and 48 hours of incubation to show differences in hemolysis in diameter. The results at 24 hours, the average hemolytic diameter of ADM did not show hemolysis (0.00mm) and was different from ADD (0.40mm). , 10mm). Based on the above results, in the future, it is necessary to control other variables that might influence such as Hb and age of erythrocytes, agar thickness, pH used, and planting techniques (strict) to obtain maximum growth results

PENDAHULUAN

Streptococcus β hemolisa merupakan salah satu bakteri patogen yang banyak menginfeksi manusia. Bakteri ini berada di lapisan superfisial epidermis atau permukaan kulit manusia dan membran mukosa, seperti epitel mukosa orofaring, epitel nasal, traktus genital, dan daerah perianal (Jawetz, 2008). Carrier *Streptococcus β* hemolisa dapat ditemukan di saluran pernafasan, namun kadang tidak menimbulkan penyakit akan tetapi dapat berisiko untuk menyebarkan penyakit (Jati, 2012),

Infeksi yang ditimbulkan akibat *Streptococcus β* hemolisa ini terjadi karena adanya interaksi faktor-faktor virulensi *Streptococcus β* hemolisa yang berupa

protein yang disekresikan maupun yang ada di permukaan sel dengan sel host. Faktor virulensi yang disekresikan antara lain streptokinase, hialuronidase, proteinase dan hemolisin (Brooks, 2008). *Streptococcus β* hemolisa dapat menyebabkan berbagai macam penyakit pada manusia, seperti radang tenggorokan, faringitis, impetigo, erisipelas, demam nifas, scarlet fever, necrotizing fasciitis, toxic shock syndrome, septikemia (Research Occupational Health Program Boston University, 2012).

Media pertumbuhan adalah bahan yang terdiri dari nutrisi yang diperlukan mikroorganisme untuk melakukan pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi tersebut untuk menyusun

komponen sel. Isolasi mikroorganismenya menggunakan media pertumbuhan dapat digunakan sebagai kultur murni. (Tenny O, 2014)

Agar darah domba adalah media standart sebagai media pertumbuhan untuk mengidentifikasi jenis bakteri dan sebagai media untuk tes sensitivitas antibiotik dari berbagai bakteri patogen. Namun penggunaan darah domba wol di negara yang berkembang seperti Indonesia susah untuk diwujudkan karena domba wol tidak dapat beradaptasi dengan iklim tropis seperti iklim di Indonesia (Fawzia, 2018)

Negara berkembang seperti Indonesia penggunaan agar darah manusia untuk pemeriksaan mikrobiologi rutin dilakukan. Hal ini dikarenakan iklim di Indonesia kurang mendukung untuk memelihara domba sebagai penyuplai darah untuk dipakai menjadi salah satu bahan pembuat agar darah. Berdasarkan data diatas perlu dilakukan penelitian terkait perbedaan pertumbuhan *Streptococcus* β hemolisa pada agar darah domba (ADD) dengan agar darah manusia (ADM) (Abdat, 2010)

METODE PENELITIAN

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah bidang ilmu Mikrobiologi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan jenis sampel yang digunakan adalah darah domba dan manusia yang dijadikan media agar dan ditanamkan bakteri uji yaitu *Streptococcus Beta Hemolitycus* untuk dibaca kemampuan zona hemolisisnya. Setelah dilakukan strict bakteri ke media blood agar, dilakukan inkubasi untuk membuat menumbuhkan bakteri dalam media. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan diameter zona hemolisa dari pertumbuhan bakteri dalam media agar tersebut. Hasil kemudian dicatat dan media tersebut diinkubasi kembali selama 24 jam kedua dan dilakukan pengamatan kembali diameter zona hemolisa.

Alat dan Bahan yang digunakan adalah sebagai berikut yaitu Ose Steril, Bunsen, Tabung Raksi, Glass

Beads, Pipet, Inkubator, Petridish, Laminar Air Flow, Vernier Caliper, AutoClave, Darah Domba Defibrinasi, Darah Manusia Citrat, Blood Agar Serbuk Oxoid, dan Aquadest.

Setelah alat dan bahan telah disiapkan, dilanjutkan dengan membuat media kultur dan penanaman kuman dengan cara sebagai berikut:

1. Encerkan serbuk Reagen Blood Agar dengan aquades sesuai dengan perbandingan pengenceran yang tertera pada instruksi media tersebut.
2. Aduk merata, kemudian dididihkan.
3. Setelah itu masukkan kedalam autoclave selama 30 menit.
4. Dinginkan sampai kira-kira 45-55°C, kemudian tambahkan darah domba/darah manusia.
5. Aduk merata, dan tuangkan pada petridish steril 15-20 ml.
6. Biarkan dingin, kemudian lakukan uji sterilitas dengan menginkubasi media 37°C selama 24 jam
7. Bila tidak terdapat pertumbuhan/kontaminasi, media layak digunakan.
8. Setelah media siap digunakan, siapkan alat dan bahan untuk melakukan penanaman bakteri uji
9. Pijarkan ose diatas Bunsen, dinginkan pada media agar
10. Ambil satu mata ose pada biakan *Streptococcus Beta Hemolitycus*
11. Buat Strict 4 zona pada lempeng sampel agar darah domba (ADD) dan agar darah manusia (ADM)
12. Inkubasi pada 37C dan amati pada 24 dan 48 jam

Besaran sampel yang digunakan dihitung menggunakan rumus perhitungan federer sebagai berikut:

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

Keterangan:

t : Perlakuan n : Ulangan/Replikasi

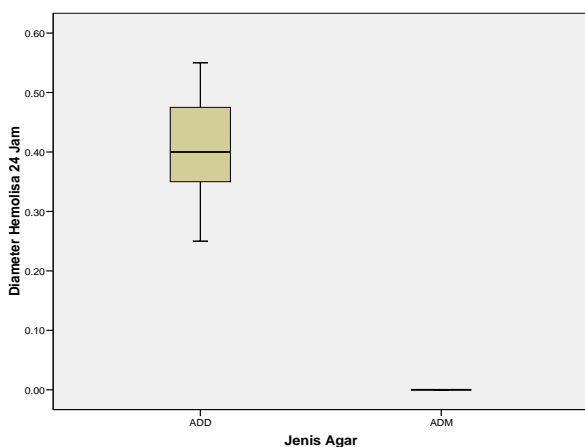
Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan 2 perlakuan sampel yaitu penanaman agar darah domba standard (defibrinasi) dan penanaman agar darah manusia standard (darah citrat) maka didapatkan

replikasi minimal yang dibutuhkan setiap perlakuan adalah sebesar 16 kali. Data dari 16 sampel dengan 2 perlakuan kemudian dilakukan uji statistik menggunakan *Paired Sample T Test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN HASIL

Agar darah manusia yang digunakan pada penelitian ini berasal dari whole blood yang diambil dari UTD PMI Embong Ploso Surabaya yang kemudian dibuat menjadi Agar Darah Manusia (ADM) dengan kadar hematokrit sebesar 40-50%. Sedangkan Agar Darah Domba (ADD) dibuat dari whole blood darah domba yang didefibrinasi.

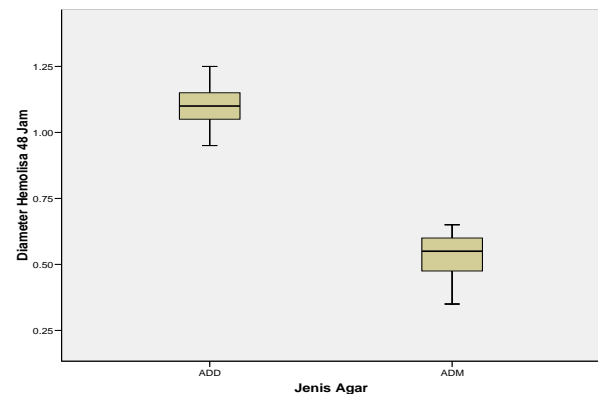
Perbandingan pertumbuhan bakteri *Streptococcus β hemolyticus* pada kedua media (ADD dan ADM) pada pengamatan setelah inkubasi 24 jam dapat dilihat pada gambar grafik berikut ini :



Grafik 1. Diameter hemolisa *Streptococcus β hemolyticus* pada ADD dan ADM setelah inkubasi selama 24 jam. Nilai $p=0,000$ (*Paired Sample T Test*)

Grafik 1 menunjukkan pertumbuhan dengan diameter hemolisa *Streptococcus β hemolyticus* pada ADD yang di inkubasi selama 24 jam terlihat sebesar 0,40 mm dan pada ADM belum terjadi hemolisa. Hasil ini tetap menunjukkan perbedaan bermakna statistik dengan nilai $p=0,000$ (*Paired Sample T Test*). Kuman *Streptococcus β hemolisa* yang ditanam pada ADD dan ADM diamati pertumbuhannya setelah 24 dan 48 jam inkubasi yang mencakup hemolisis *Streptococcus β hemolisa*.

Pada pengamatan 24 jam, pertumbuhan pada ADM *Streptococcus β hemolisa* tumbuh lebih lambat daripada ADD. Hal ini dikarenakan komplemen, antibodi, serta antikoagulan sitrat yang bersifat bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri) yang terdapat pada ADM sehingga *Streptococcus β hemolisa* tumbuh kurang optimal (Ravi, 2007).



Grafik 2. Diameter hemolisa *Streptococcus β hemolyticus* pada ADD dan ADM setelah inkubasi selama 48 jam. Nilai $p=0,000$ (*Paired Sample T Test*)

Grafik 2 menunjukkan pertumbuhan diameter hemolisa *Streptococcus β hemolyticus* pada ADD yang di inkubasi selama 24 jam terlihat lebih besar (1,10mm) dari pada pertumbuhan pada ADM (0,52mm), dengan selisih rerata 0,58mm. Hasil ini menunjukkan perbedaan bermakna statistik dengan nilai $p=0,000$ (*Paired Sample T Test*).

Pada 48 jam inkubasi, ADD dan ADM masih tetap sama sama tumbuh tetapi pertumbuhan ini bersifat lebih rendah daripada 24 jam. Dapat dijelaskan pula bahwa setelah mencapai 18-24jam masa kultur, maka bakteri memasuki fase stasioner. Dalam fase ini terdapat akumulasi limbah, kekurangan nutrisi, perubahan pH, dan perubahan faktor lain yang akan mendesak dan mengganggu biakan, sehingga bakteri mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan. Berbeda pada pengamatan 24 jam dimana bakteri mengalami fase lag dan fase eksponensial pada kurang dari 18-24 jam masa kultur dimana nutrisi masih tersedia lengkap sehingga pertumbuhan bakteri bersifat cepat pada fase ini.

Rerata diameter hemolisis pada pengamatan 24 jam pada ADM belum menunjukkan hemolisis (0,00 mm) berbeda bermakna dengan rerata diameter koloni pada ADD (0,40 mm). Kecepatan lisis ADD dipengaruhi karena darah domba memiliki kandungan sphyngomielin yang lebih tinggi yaitu 51 % daripada darah manusia yang hanya 26 % (Anand C, et.al, 2000)

Selain itu faktor lain yang mempengaruhi mudahnya aktivitas lisis dari eritrosit domba adalah modulasi permukaan dari aktivasi jalur klasik yaitu pembentukan C2 dan C3 konvertase. Pada penelitian EJ Brown menyatakan bahwa EAC14 yang digunakan C2, sedikitnya 20 kali lebih cepat pada eritrosit domba dibanding eritrosit manusia dan marmut pada perlakuan yang sama dalam jumlah molekul C1 dan C4. (Brown, 2005)

Tetapi pada 48 jam, walaupun ADM sulit di lisis oleh *Streptococcus β hemolisa* tetap menunjukkan hemolisa sama seperti pada ADD. Lisisnya eritrosit manusia yang lebih lambat daripada eritrosit domba mungkin dikarenakan perbedaan morfologi dan komposisi membran eritrosit. Secara substansial, perbedaan morfologi serta komposisi membran eritrosit antara darah domba dan darah manusia berbeda. Sel darah manusia lebih lebar dibanding dengan sel darah merah domba yang lebih kecil serta membran sel yang tipis sehingga hal ini mempengaruhi kemampuan hemolisis *Streptococcus β hemolisa* dalam melisis sel darah merah manusia pada ADM. (David, 1995).

Kemungkinan yang lain yaitu dikarenakan umur eritrosit darah yang berasal dari packed-red-cell yang tidak diketahui umurnya kemungkinan menyebabkan penurunan fragilitas pada membran. Penelitian yang dilakukan oleh Michael Föller et al menyatakan bahwa kematian terprogram dari eritrosit matur ditandai dengan penurunan volume sel, kebocoran membran sel dan kerusakan sel membran secara asimetri karena paparan permukaan sel oleh phosphatidylserine. (Leboffe, 2012)

Penelitian lain menyatakan terjadi penurunan aktifitas glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) dan membrane-bound b5R (b5Rm) pada membran eritrosit matur. Penurunan keduanya menyebabkan penurunan respon antioksidan sehingga eritrosit menjadi lebih mudah rusak. Kedua hal tersebut kemungkinan menyebabkan eritrosit yang telah matur lebih mudah dilisis oleh hemolisis dibanding eritrosit muda sehingga hemolisis tetap terjadi walaupun lebih lambat dan aktifitas hemolisis pada ADM membutuhkan waktu yang lebih lama. (Abdat, 2010)

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan hemolisis *Streptococcus β hemolyticus* pada agar darah domba (ADD) dengan agar darah manusia (ADM). Pertumbuhan hemolisis *Streptococcus β hemolisa* paling cepat pada agar darah domba dibandingkan dengan agar darah manusia. Bagi laboratorium yang memiliki keterbatasan dalam mendapatkan darah domba, dapat menggunakan darah manusia sebagai media agar darah alternatif untuk kultur *Streptococcus β hemolisa* dengan catatan hemolisis mungkin baru tampak pada lebih dari sama dengan 24 jam inkubasi. Pada penelitian kedepannya perlu dilakukan pengontrolan terhadap variabel lain seperti kadar Hb dan umur eritrosit. Perlu diperhatikan dalam pembuatan media hendaknya dilakukan sesuai standar tiap reagen, seperti komposisi darah, ketebalan agar, pH agar serta teknik stricht yang benar sehingga diharapkan dapat terjadi pertumbuhan kuman *Streptococcus β hemolisa* yang optimal pada agar darah tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdat, Amali. (2010). Pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* pada agar darah manusia dan agar darah domba. Artikel Ilmiah. Semarang: Universitas Diponegoro
- Anand C, et al. (2000) Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media. J. Clin Microbiol.;38:591-594.

- Brooks GF, et al. (2008). Mikrobiologi Kedokteran (terjemahan). Edisi ke-23. Jakarta: EGC
- Brown, A. E. (2005). Microbiological Applications, Ninth Edition. Mc Graw Hill. Auburn University. New York
- Fawzia, N.,e et al. (2018). Darah Domba dengan Agar Darah Manusia Pengaruh Preinkubasi dalam Supplemented Toddhewitt Broth (STHB). Jurnal Kedokteran Diponegoro, volume 7, ISSN Online: 2540-8844
- Greenwood David, Richard Slack, John Peutherer, (1995). Medical Microbiology “ A Guide to Microbial Infections, Pathogenesis, Imunity, Laboratory Diagnosis and Control”. Churchill Livingstone : Elsevier
- Jati, Sumilih (2012). Darah manusia yang dicuci sebagai alternatif meningkatkan kemampuan menumbuhkan Streptococcus pneumoniapada agar media agar . Artikel Ilmiah. Semarang: Universitas Diponegoro
- Jawetz. (2008). Medical Microbiology. Edisi 23. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Leboffe J. et al. (2012). Brief Microbiology Laboratory Theory and Application Second Edition. Morton : Englewood
- Ravi S. Kasinathan, et al. (2007). Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 293: R1127-34.
- Research Occupational Health Program Boston University. (2012). Streptococcus pyogenes. America
- Tenny, O., Egwuatu. (2014). Effect of Blood Agar from Different Animal Blood on Growth Rates and Morphology of Common Pathogenic Bacteria. Advances in Microbiology, 4, 1237-1241 Published Online December 2014 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/aim>