

## Pengembangan Media Padat untuk Menumbuhkan *Mycobacterium bovis*

### (DEVELOPMENT OF SOLID MEDIUM FOR MYCOBACTERIUM BOVIS CULTIVATION)

Mazdani Ulfah Daulay<sup>1,2</sup>, Mirnawati Sudarwanto<sup>3</sup>,  
Widagdo Sri Nugroho<sup>4</sup>, Etih Sudarnika<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP)  
Jl. Pemuda No. 64 kav. 16-17, Rawamangun, Jakarta Timur 13220,  
Telp. (021) 4892020, email: mazdani\_daulay@yahoo.com

<sup>2</sup>Mahasiswa S3 Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner,  
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan IPB,  
Jl. Agatis Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

<sup>4</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Fauna No. 2 Karangmalang, Yogyakarta

### ABSTRAK

Kultur mikobakteri merupakan diagnosis definitif terhadap tuberkulosis (TB), tetapi media kultur komersial untuk *Mycobacterium bovis* masih jarang tersedia. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan menilai kemampuan media Modifikasi Ogawa Agar (MOA) untuk menumbuhkan *M. bovis*, dibandingkan dengan media yang digunakan saat ini, yaitu *Löwenstein Jensen* (LJ) dan Modifikasi Ogawa (MO). Suspensi bakteri *M. bovis* dan *M. phlei* dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan konsentrasi  $10^5$  CFU/mL masing-masing diinokulasikan 0,1 mL pada media LJ, MO, dan MOA, masing-masing lima tabung untuk tiap media. Bakteri *M. phlei* tumbuh pada semua media mulai hari ke-4. Bakteri *M. bovis* tumbuh pada media LJ dan MO mulai hari ke-17, tetapi tidak berhasil tumbuh pada media MOA. Perbandingan jumlah koloni *M. phlei* yang tumbuh pada media LJ dan MOA berbeda nyata secara statistika. Kemampuan media MOA untuk menumbuhkan *M. phlei* berbeda jika dibandingkan dengan media LJ. Koloni *M. phlei* pada media MOA lebih mudah dipanen, dan pembuatannya lebih sederhana dibandingkan dengan media LJ. Kemampuan media LJ dan MO dalam menumbuhkan *M. bovis* tidak ada perbedaan, tetapi media MO lebih sederhana dibandingkan dengan media LJ. Media MOA mampu menumbuhkan *M. phlei*, tetapi dalam penelitian ini belum terbukti mampu menumbuhkan *M. bovis*.

Kata-kata kunci: *Mycobacterium bovis*, kultur mikobakteri, media kultur

### ABSTRACT

Mycobacterial culture provides definitive diagnosis of tuberculosis (TB), but commercially ready-to-use culture media for *Mycobacterium bovis* are rarely available. The aims of this study were to develop and to evaluate the ability of *M. Bovis* to grow in Modified Ogawa Agar (MOA) in comparison with the available culture media, such as *Löwenstein Jensen* (LJ) and Modified Ogawa (MO). Each media were inoculation with 0.1 ml suspension of  $10^5$  CFU/mL *M. bovis* and *M. phlei* in Phosphate Buffer Saline (PBS) and each media was replicated in five tubes. *Mycobacterium phlei* grew in every medium since day 4. *M. bovis* grew in media LJ and MO since day 17, but failed to grow in medium MOA. The recovery rate of *M. phlei* in LJ and MOA were significantly different. The ability of MOA to cultivate *M. phlei* was different from LJ. Colonies of *M. phlei* in MOA were easier to be harvested, much simpler to prepare, and more feasible than medium LJ. The recovery rate of *M. bovis* in media LJ and MO were not significantly different, but medium MO were much simpler to prepare and more feasible than medium LJ. Media MOA were able to cultivate *M. phlei*, but proven unable to cultivate *M. bovis* in this research.

Key words: *Mycobacterium bovis*, mycobacterial culture, culture media

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB), merupakan penyakit infeksius yang tersebar luas di seluruh dunia, disebabkan oleh infeksi organisme yang merupakan anggota *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC, tuberkel basili mamalia). Bakteri MTBC adalah kelompok patogen yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada manusia, serta mengakibatkan kerugian ekonomi pada bidang pertanian di dunia (Keating *et al.*, 2005). Bakteri MTBC terdiri atas kelompok mikobakteri yang sangat erat hubungannya, meliputi beberapa spesies, yaitu *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, dan *M. microti*. Bakteri MTBC juga terdiri dari beberapa varian yang status taksonominya masih menjadi subjek perdebatan (de la Rua-Domenech, 2006). Bakteri MTBC meliputi semua mikobakteri yang menginduksi TB pada mamalia, kecuali *M. avium* (Corbett *et al.*, 2003).

Bakteri *M. bovis* merupakan agen penyebab mayoritas kasus TB pada ternak (*Bovine Tuberculosis*/BTB) dan sejumlah besar spesies hewan piara, serta spesies mamalia liar, dengan akibat berupa penyakit saluran pernapasan yang kronis dan progresif. Bakteri *M. bovis* memiliki cakupan inang yang luas, juga meliputi manusia. Infeksi dapat disebarkan melalui susu atau daging yang terkontaminasi, atau secara langsung melalui inhalasi dari hewan atau karkas terinfeksi. Dalam dua dekade terakhir, infeksi pada manusia akibat bakteri tersebut terhitung kecil proporsinya (0,5-7,2%) pada negara-negara industri (Grange dan Yates, 1994; Cosivi *et al.*, 1998). Sebaliknya, di negara-negara berkembang infeksi *M. bovis* tampaknya merupakan ancaman utama bagi kesehatan masyarakat (Ayele *et al.*, 2004). Akibat kurangnya kemampuan laboratorium dalam mengisolasi dan membedakan organisme ini dari bakteri MTBC lainnya, maka kasus-kasus TB yang disebabkan oleh *M. bovis* pada kebanyakan negara berkembang tidak diketahui, meskipun tampaknya lebih tinggi dibandingkan dengan di negara-negara industri (Cosivi *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2010).

Diagnosis TB dan *monitoring* kemajuan pengendaliannya sangat bergantung pada pemeriksaan bakteriologi terhadap spesimen klinis (Weyer *et al.*, 1998a). Beberapa metode diagnosis TB yang ada saat ini antara lain: preparat ulas dahak menggunakan pewarnaan asam, uji tuberkulin, uji gamma interferon, uji

proliferasi limfosit, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Akan tetapi, diagnosis definitif terhadap TB hanya dapat dilakukan dengan kultur mikobakteri (OIE, 2009; Parsons *et al.*, 2011).

Mikobakteri tidak tumbuh pada media dengan unsur kimia sederhana, melainkan membutuhkan media khusus yang tidak digunakan oleh mikroorganisme lain. Pertumbuhan mikobakteri lambat, membutuhkan 3-6 minggu atau lebih untuk membentuk koloni. Kultur biasanya dibuat dalam tabung *screw cap*, bukan pada cawan petri, karena kandungan mikobakteri dalam spesimen umumnya sangat kecil. Penggunaan tabung, yang dapat ditutup rapat, dimaksudkan untuk mencegah mengeringnya kultur akibat masa inkubasi yang lama, sebagaimana terjadi pada cawan petri (Weyer *et al.*, 1998b). Berbagai macam faktor, seperti komposisi media kultur, kondisi fisik inkubasi, dan suhu sangat berpengaruh terhadap metabolisme bakteri (Masood *et al.*, 1985).

Media untuk biakan mikobakteri dibagi ke dalam tiga kelompok utama, yaitu media berbasis telur, media berbasis agar, dan media cair. Media ideal untuk isolasi tuberkel basili harus (a) ekonomis dan mudah dibuat, (b) menghambat pertumbuhan kontaminan, (c) mendorong mikobakteri yang jumlahnya hanya sedikit dapat tumbuh dengan subur, dan (d) memungkinkan melakukan deferensiasi isolat secara dini berdasarkan morfologi koloni (Weyer *et al.*, 1998b).

Media yang dapat menumbuhkan *M. tuberculosis* adalah *Löwenstein Jensen* (LJ) yang mengandung telur dan diperkaya dengan gliserol dan asparagin, serta media agar maupun cair yang diberi serum atau albumin sapi. Metode kultur dapat meningkatkan jumlah temuan kasus TB, dan mendeteksi kasus lebih dini. Mikobakteri mudah terhambat pertumbuhannya oleh kontaminan yang mampu tumbuh dengan cepat, misalnya bakteri lain dan jamur (Weyer *et al.*, 1998a).

Media LJ, yang merupakan modifikasi *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD), saat ini digunakan secara luas untuk kultur TB. Media LJ mengandung gliserol yang menyuburkan pertumbuhan *M. tuberculosis*. Jika komponen gliserol pada media LJ digantikan dengan piruvat, maka akan meningkatkan pertumbuhan *M. bovis*. Untuk kultivasi *M. bovis*,

media LJ diperkaya dengan 0,5% sodium piruvat, tanpa gliserol. Media Ogawa atau modifikasi Ogawa lebih murah daripada media LJ karena dibuat tanpa asparagin (Weyer *et al.*, 1998b). Saat ini, glutamat dinyatakan sebagai sumber nitrogen yang lebih baik dibanding asparagin (Masood *et al.*, 1985).

Media LJ maupun Ogawa komersial dapat diperoleh dalam bentuk siap pakai, dengan harga yang cukup mahal, dan umumnya untuk menumbuhkan *M. tuberculosis*. Media komersial untuk menumbuhkan *M. bovis* masih jarang tersedia, bahkan pengembangan media kultivasi *M. bovis* pun jarang dilakukan. Oleh karena itu, dibutuhkan media alternatif yang mampu menumbuhkan *M. bovis* dengan cara pembuatan yang lebih sederhana, dengan biaya yang lebih murah, dan menghasilkan pertumbuhan *M. bovis* yang lebih baik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan menilai kemampuan media Modifikasi Ogawa Agar (MOA) untuk menumbuhkan *M. bovis*, dibandingkan dengan media yang digunakan saat ini, yaitu *Löwenstein Jensen* (LJ) dan Modifikasi Ogawa (MO).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Tuberkulosis, Bagian Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet), Bogor.

### Isolat *M. bovis* dan *M. phlei*

Isolat bakteri *M. bovis* yang digunakan adalah isolat murni berbentuk kering beku yang diisolasi dari sapi perah dengan nama isolat Pasar Minggu, milik Bbalitvet, Bogor. Isolat tersebut telah dikonfirmasi dengan metode pengujian *Multiplex* PCR dengan primer *forward* CSB1 5'-TTC CGA ATC CCT TGT GA-3', dan dua primer *reverse*, yaitu spesifik terhadap *M. bovis*, CSB2, 5'-GGA GAG CGC CGT TGT A-3' serta spesifik terhadap *M. tuberculosis*, CSB3, 5'-AGT CGC GTG GCT TCT CTT TTA-3' (Bakshi *et al.*, 2005). Isolat bakteri yang dapat menjadi representasi dari *M. bovis*, yaitu *M. phlei*, merupakan isolat murni berbentuk kering beku *Bbalitvet Culture Collection* (BCC) dengan nomor BCC0666.

### Media Kultur

Media *Löwenstein Jensen* (LJ) dibuat menggunakan larutan garam (*salt solution*), terdiri atas: 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,24 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

0,6 g Tri-magnesium sitrat, 3,6 g L-asparagin, 1 g sodium glutamat, 6,5 g sodium piruvat. Larutan tersebut dilarutkan dalam aquades hingga 600 mL, dihomogenkan dengan *stirer*, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan tersebut ditambah 1.000 mL *whole egg*, dihomogenkan, dan diberi 20 mL *malachite green* 2%.

Media Modifikasi Ogawa (MO) dibuat menggunakan larutan garam, terdiri atas: 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g sodium glutamat, 1,2 g sodium piruvat. Larutan tersebut dilarutkan dalam aquades hingga 200 mL, dihomogenkan dengan *stirer*, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan tersebut ditambah 400 mL *whole egg*, dihomogenkan, dan diberi 12 mL *malachite green* 2%.

Campuran larutan garam dan emulsi *whole egg* dibagi ke dalam tabung-tabung steril, masing-masing sebanyak 10 mL. Tabung diposisikan dengan kemiringan 45°, dimasukkan dalam inkubator bersuhu 85°C selama 45 menit atau hingga menjadi padat.

Media Modifikasi Ogawa Agar (MOA) dibuat menggunakan larutan garam, terdiri atas: 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g sodium glutamat, 1,2 g sodium piruvat. Larutan tersebut ditambah 14 g agar *Noble*, ditambah aquades hingga 540 mL, dihomogenkan dengan *stirer*, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Larutan didinginkan hingga suhu 50°C, ditambahkan 140 mL kuning telur dan 12 mL *malachite green* 2%, dihomogenkan, dibagi ke dalam lima tabung steril, masing-masing sebanyak 10 mL. Tabung diposisikan dengan kemiringan 45° sampai media menjadi padat. Untuk menguji sterilitasnya, media diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Media kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

### Suspensi Isolat *M. bovis* dan *M. phlei*

Koloni *M. bovis* dan *M. phlei* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung *glass beads* steril dan berisi 10 mM PBS pH 7,2. Suspensi dihomogenisasi dan diukur konsentrasi jumlah bakterinya berdasarkan metode Bollela *et al.*, (1999), yaitu menggunakan metode McFarland nomor 1, dengan estimasi akhir jumlah koloni  $10^5$  *colony forming unit* (CFU)/mL. Suspensi bakteri *M. bovis* dan *M. phlei* masing-masing diinokulasikan 0,1 mL pada media LJ, MO, dan MOA, sebanyak lima tabung untuk masing-masing media. Tabung diinkubasikan pada suhu 37°C. Untuk media

LJ dan MO, tabung diletakkan miring dan tutupnya dilonggarkan selama satu malam. Selanjutnya, tabung diletakkan tegak, tutupnya dirapatkan, dan diinkubasikan kembali. Untuk media MOA, tabung diletakkan pada posisi miring selama seminggu. Pertumbuhan koloni *M. bovis* maupun *M. phlei* diamati setiap hari.

### Analisis Data

Perbedaan kemampuan media dalam menumbuhkan *M. phlei* dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (*Analysis of Variance*). Jika hasil sidik ragam menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji wilayah berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test/DMRT*). Perbedaan kemampuan media dalam menumbuhkan *M. bovis* dianalisis dengan menggunakan uji-t.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam OIE (2009) diuraikan bahwa isolasi primer *M. bovis* menggunakan media padat berbasis telur, seperti *Löwenstein Jensen*, berbasis *coletso* atau *stonebrink*. Media tersebut harus mengandung piruvat, atau piruvat dan gliserol. Media berbasis agar seperti *Middlebrook 7H10* atau *7H11* atau media agar berbasis darah juga dapat digunakan. Menurut Stager *et al.* (1991) dan Cruciani *et al.* (2004), penggunaan media LJ yang dikombinasikan dengan media cair akan dapat meningkatkan kemampuan media untuk mendiagnosis infeksi mikobakteri. Weyer *et al.* (1998b) menyatakan bahwa terdapat media yang lebih murah

daripada media LJ, yaitu media Ogawa atau modifikasi Ogawa, karena tidak menggunakan asparagin. Berdasarkan pernyataan tersebut, modifikasi terhadap media Ogawa yang telah ada saat ini diharapkan menghasilkan media dengan biaya yang lebih murah dan lebih sederhana pembuatannya.

Media MOA merupakan media baru, hasil modifikasi terhadap media Modifikasi Ogawa, dengan mengganti emulsi *whole egg* dengan kuning telur dan agar. Media LJ maupun MO dalam penelitian ini pada dasarnya adalah media hasil modifikasi, karena media aslinya menggunakan gliserol, yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *M. tuberculosis*. Perbandingan komposisi media Löwenstein Jensen, Modifikasi Ogawa, dan Modifikasi Ogawa Agar disajikan pada Tabel 1, sedangkan gambar media pada Gambar 1.

Penggantian emulsi *whole egg* dengan kuning telur dan agar dimaksudkan dengan pertimbangan bahwa media berbasis emulsi *whole egg* sifatnya tidak keras, sehingga agak sulit untuk memanen koloni mikobakteri hasil kultivasi. Kuning telur yang dikombinasikan dengan agar dimaksudkan untuk memberikan tekstur media yang lebih keras, sehingga panen koloni mikobakteri dapat dilakukan dengan lebih mudah, tetapi tidak menghilangkan unsur kuning telur yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *M. bovis*.

Pemilihan *M. phlei* sebagai representasi dari *M. bovis* dalam menilai kemampuan media untuk menumbuhkan *M. bovis* berdasarkan sudut pandang Pratt (1952), bahwa kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri tahan asam

Tabel 1. Perbandingan komposisi media Löwenstein Jensen (LJ), Modifikasi Ogawa (MO), dan Modifikasi Ogawa Agar (MOA)

Bahan	LJ	MO	MOA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,40 g	3,0 g	3,0 g
Sodium Glutamat	1,00 g	2,0 g	2,0 g
Sodium Piruvat	6,50 g	1,2 g	1,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,24 g	-	-
Tri-Magnesium Citrat	0,60 g	-	-
L-asparagin	3,60 g	-	-
Aquades	600 mL	200 mL	540 mL
Whole egg	1000 mL	400 mL	-
Agar Noble	-	-	14,0 g
Kuning telur	-	-	140 mL
Malachite green (2%)	20 mL	12 mL	12 mL
pH	6,6	6,2	6,2

patogenik yang optimal memiliki banyak kesamaan dengan bakteri tahan asam non patogenik. Bakteri *M. phlei* tumbuh dengan cepat jika dibandingkan dengan *M. bovis*, dan lebih aman untuk digunakan karena sifatnya yang non patogenik. Menurut Biberstein dan Hirsh (1999), berdasarkan perbedaan waktu perkembangbiakannya, mikobakteri dapat dibagi menjadi tumbuh lambat (membutuhkan waktu lebih dari tujuh hari untuk membentuk koloni) dan tumbuh cepat (membentuk koloni dalam waktu tujuh hari). Bakteri *M. bovis* tergolong dalam mikobakteri tumbuh lambat, sedangkan *M. phlei* tergolong tumbuh cepat.

Bakteri *M. phlei* tumbuh pada semua media mulai hari ke-4. Berdasarkan analisis statistika menggunakan sidik ragam, dilanjutkan dengan DMRT, kemampuan media LJ dan MO, maupun MO dan MOA dalam menumbuhkan *M. phlei* pada hari ke-4, 6, dan 7 tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Perbedaan ditunjukkan oleh media LJ dan MOA ( $P<0,05$ ). Pada hari ke-5, kemampuan media MO dan MOA dalam menumbuhkan *M. phlei* tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ), tetapi LJ dan MO, maupun LJ dan MOA berbeda nyata ( $P<0,05$ ). Hasil analisis statistika selengkapnya tersaji pada Tabel 2, dan pertumbuhan *M. phlei* ditampilkan pada Gambar 2. Perbandingan jumlah koloni *M. phlei* yang tumbuh pada media LJ dan MOA berbeda nyata secara statistika. Artinya, kemampuan media MOA untuk menumbuhkan *M. phlei* berbeda jika dibandingkan dengan media LJ. Koloni *M. phlei* pada media MOA lebih mudah dipanen, pembuatannya lebih sederhana dan lebih ekonomis dibandingkan dengan media LJ. Koloni *M. phlei* pada media MOA lebih mudah dipanen karena media MOA yang berbasis agar memiliki konsistensi lebih keras dibanding media LJ yang berbasis telur. Pembuatan media MOA lebih

sederhana dan lebih ekonomis dibandingkan dengan media LJ, karena tanpa asparagin.

Bakteri *M. bovis* tumbuh pada media LJ dan MO mulai hari ke-17, tetapi tidak berhasil tumbuh pada media MOA. Media MOA gagal menumbuhkan *M. bovis*, sehingga kemampuan media LJ dan MO dalam menumbuhkan *M. bovis* dianalisis dengan uji-t. Hasil analisis uji-t menunjukkan bahwa kemampuan media LJ dan MO dalam menumbuhkan *M. bovis* pada hari ke-17, 21, 25, 27, 29, 32, dan 36 tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Hasil analisis statistika selengkapnya tersaji pada Tabel 3, dan pertumbuhan *M. bovis* ditampilkan pada Gambar 3. Kemampuan media LJ dan MO dalam menumbuhkan *M. bovis* tidak ada perbedaan, tetapi media MO lebih sederhana dan lebih ekonomis dibandingkan dengan media LJ, karena tanpa asparagin.

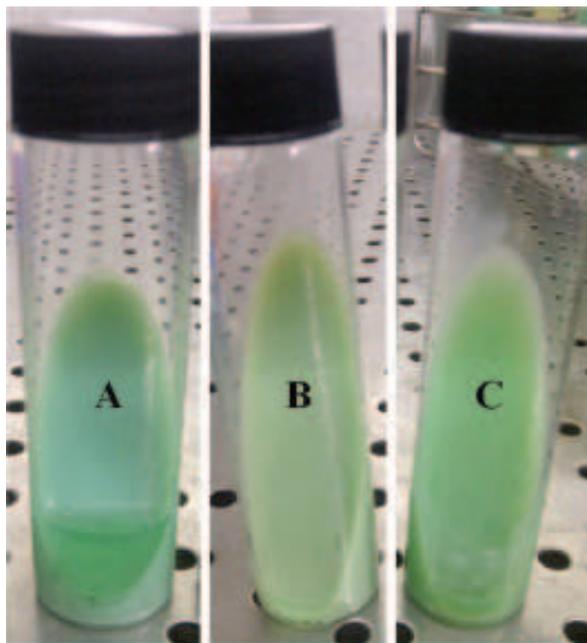
Bakteri *M. bovis* tidak tumbuh pada media MOA kemungkinan karena kualitas media MOA untuk kultivasi *M. bovis* ini tidak sebaik yang digunakan untuk kultivasi *M. phlei*. Media untuk kultivasi *M. phlei* dan *M. bovis* dibuat dalam satu pembuatan yang sama, pada waktu yang sama. Akan tetapi, kualitasnya dapat berbeda, akibat perbedaan waktu pembagian larutan ke dalam tabung-tabung. Selain itu, perlu ditinjau kembali waktu yang dibutuhkan untuk inokulasi suspensi bakteri *M. bovis* pada MOA, yaitu peletakan tabung dalam posisi miring setelah diberi suspensi bakteri. Perlakuan untuk MOA berbeda dari media berbasis emulsi *whole egg* karena konsistensi media berbasis agar lebih keras, sehingga perlu dipastikan berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk suspensi bakteri *M. bovis* mampu melekat pada permukaan media MOA.

Menurut Dean *et al.* (2005), 1 CFU *M. bovis* cukup untuk menimbulkan TB pada ternak.

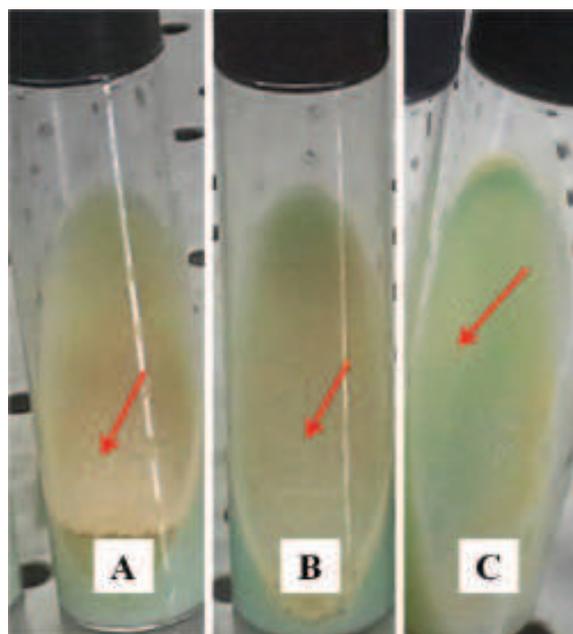
Tabel 2. Pertumbuhan *M. phlei* pada media Löwenstein Jensen (LJ), Modifikasi Ogawa (MO), dan Modifikasi Ogawa Agar (MOA)

Hari ke	Rataan + galat baku koloni <i>M. phlei</i> yang tumbuh (CFU/tabung)		
	LJ	MO	MOA
4	12,80 + 1,530 <sup>a</sup>	16,00 + 1,673 <sup>ab</sup>	17,60 + 0,748 <sup>b</sup>
5	25,40 + 2,358 <sup>a</sup>	31,40 + 2,159 <sup>b</sup>	34,00 + 0,447 <sup>b</sup>
6	50,20 + 8,913 <sup>a</sup>	66,40 + 8,128 <sup>ab</sup>	75,80 + 0,800 <sup>b</sup>
7	130,00 + 48,990 <sup>a</sup>	210,00 + 40,000 <sup>ab</sup>	250,00 + 0,000 <sup>b</sup>

Keterangan : huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $p<0,05$ ).

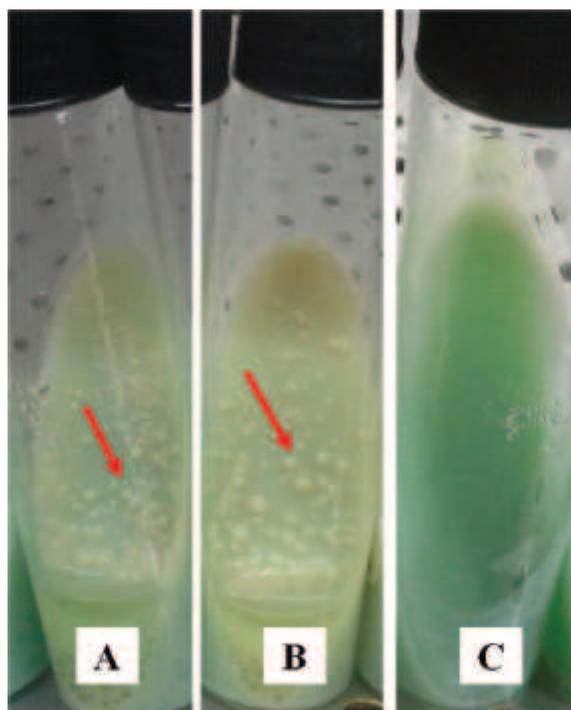


Gambar 1 Media *Löwenstein Jensen/LJ* (A), Modifikasi Ogawa/MO (B), dan Modifikasi Ogawa Agar/MOA (C)



Gambar 2. Pertumbuhan *M. phlei* pada media *Löwenstein Jensen/LJ* (A), Modifikasi Ogawa/MO (B), dan Modifikasi Ogawa Agar/MOA (C)

Kerusakan patologi yang ditimbulkan sebanding dengan yang dihasilkan oleh dosis mikobakteri yang lebih tinggi yang diinfeksi ke ternak. Ternak yang diinfeksi dengan 1 CFU/mL



Gambar 3. Pertumbuhan *M. bovis* pada media *Löwenstein Jensen/LJ* (A), Modifikasi Ogawa/MO (B), dan Modifikasi Ogawa Agar/MOA (C)

memberikan respons positif yang kuat terhadap uji tuberkulin (1 CFU/mL *M. bovis* tercatat mengandung 6-10 sel basilus). Walaupun 1 CFU/mL *M. bovis* merupakan dosis infeksi yang cukup untuk menimbulkan TB, jumlah inokulan bakteri yang ditumbuhkan pada media dalam penelitian ini adalah  $10^5$  CFU/mL, untuk memastikan pertumbuhannya.

Bakteri *M. bovis* disebut *disgonik*, atau pertumbuhannya buruk pada media yang mengandung gliserol, karena tidak mampu menggunakan gliserol sebagai sumber karbon tunggal, dan membutuhkan piruvat dalam media untuk dapat tumbuh. Sebaliknya, *M. tuberculosis* disebut *eugonik* karena tumbuh subur dalam media yang mengandung gliserol. Ketidakmampuan *M. bovis* untuk tumbuh dengan gliserol sebagai sumber karbon tunggal lebih berkaitan dengan efek penggantian asam amino yang merusak keberadaan enzim (Keating *et al.*, 2005).

Media baru berbasis agar (MOA) memiliki kelebihan dibanding media berbasis telur lainnya (LJ dan MO), yaitu konsistensinya lebih keras, sehingga koloni bakteri lebih mudah dipanen. Namun demikian, MOA memiliki kelemahan, yaitu tidak mengandung komponen

Tabel 3. Pertumbuhan *M. bovis* pada media Löwenstein Jensen (LJ), dan Modifikasi Ogawa (MO)

Hari ke	Rataan + galat baku koloni <i>M. bovis</i> yang tumbuh (CFU/tabung)	
	LJ	MO
17	14,20 + 4,259 <sup>a</sup>	4,60 + 1,249 <sup>a</sup>
21	27,40 + 6,615 <sup>a</sup>	13,60 + 4,354 <sup>a</sup>
25	50,40 + 12,844 <sup>a</sup>	41,40 + 8,060 <sup>a</sup>
27	73,80 + 10,754 <sup>a</sup>	69,80 + 13,603 <sup>a</sup>
29	79,40 + 8,530 <sup>a</sup>	75,60 + 10,847 <sup>a</sup>
32	93,20 + 6,800 <sup>a</sup>	89,00 + 6,782 <sup>a</sup>
36	96,20 + 3,800 <sup>a</sup>	100,00 + 0,000 <sup>a</sup>

Keterangan : huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (p<0,05).

albumin. Menurut Ratledge (2007), albumin mengandung transferin dan ovoferin (atau ovotransferin), yaitu molekul pengikat besi. Struktur tersebut biasanya juga mengandung residu asam hidroksi benzoat atau dihidroksi benzoat. Residu tersebut meliputi mikobaktin dan karboksikimikobaktin, yang ditemukan pada mikobakteri patogen, seperti *M. tuberculosis*, *M. avium*, atau *M. bovis*. Kompleks siderofora-besi memasuki amplop, masuk ke dalam membran sel bakteri, di tempat Fe(III) biasanya direduksi menjadi Fe(II). Namun demikian, ketiadaan albumin tidak otomatis mengakibatkan bakteri patogen tidak dapat tumbuh pada MOA, karena kuning telur juga mengandung komponen yang mampu mengikat besi.

**SIMPULAN**

Media MOA mampu menumbuhkan *M. phlei*, tetapi dalam penelitian ini belum terbukti mampu menumbuhkan *M. bovis*. Perbandingan jumlah koloni *M. phlei* yang tumbuh pada media LJ dan MOA sangat berbeda. Kemampuan media MOA untuk menumbuhkan *M. phlei* berbeda jika dibandingkan dengan media LJ. Koloni *M. phlei* pada media MOA lebih mudah dipanen, dan pembuatannya lebih sederhana dibandingkan dengan media LJ. Untuk *M. bovis*, perbandingan jumlah koloni yang tumbuh

di media LJ dan MO relatif sama, tetapi media MO lebih sederhana dibandingkan dengan media LJ.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Karantina Pertanian yang telah membantu membiayai penelitian ini, dan Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian, Kementerian Pertanian, yang telah membiayai pendidikan pascasarjana Penulis Pertama, tahun 2010-2013.

**DAFTAR PUSTAKA**

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(8): 924-937.

Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet Microbiol* 109: 211-216.

Biberstein EL, Hirsh DC. 1999. Mycobacterium species: The agents of animal tuberculosis. Dalam: Hirsh DC, Zee YC, editor. *Vet Microbiol*. Massachusetts. Blackwell Science, Inc. Hlm. 158-164.

Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL.1999. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using Mycobacterium tuberculosis as a research tool. *Braz J Med Biol Res* 32(9): 1073-1076.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. 2003. The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 163: 1009-1021.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, de Kantor I, Meslin FX. 1998. Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4(1): 59-70.

- Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. 2004. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 42(5): 2321-2325.
- de la Rúa-Domenech R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 77-109.
- Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* 73(10): 6467-6471.
- Grange JM, Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 40: 137-151.
- Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald JK, Dale J, Hewinson RG, Gordon SV. 2005. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Mol Microbiol* 56(1): 163-174.
- Masood R, Sharma YK, Venkitasubramanian TA. 1985. Metabolism of mycobacteria. *J Biosci* 7(3 & 4): 421-431.
- Michel AL, Müller B, van Helden PD. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol* 140:371-381.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2009. Bovine Tuberculosis. Dalam: *OIE Terrestrial Manual*. Paris: OIE. Hlm. 1-16.
- Parsons LM, Somoskövi Á, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. 2011. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 24(2): 314-350.
- Pratt D. 1952. Nutrition of *Mycobacterium phlei*. I. Requirements for rapid growth. *J Bact* 64: 651-658.
- Ratledge C. 2007. Iron metabolism and infection. *Food and Nutr Bulletin* 28(4) suppl : S515-S523.
- Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM, Baker JF, Carter ME. 1991. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J Clin Microbiol* 29(1): 154-157.
- Weyer K, de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, Rieder H, Valenzuela P. 1998a. *Laboratory Services in Tuberculosis Control*. Part I: Organization and Management. Geneva: WHO. Hlm. 7-10.
- Weyer K, de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, Rieder H, Valenzuela P. 1998b. *Laboratory Services in Tuberculosis Control*. Part III: Culture. Geneva: WHO. Hlm. 47-52.