

UJI KEPEKAAN OBAT ANTI TUBERKULOSIS LINI KEDUA  
MENGUNAKAN MEDIA LÖWENSTEIN JENSEN DAN  
BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tubes* (MGIT) 960

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu  
Biomedik

YUNI RUKMINIATI  
0606000270



UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN MIKROBIOLOGI  
JAKARTA  
JULI 2009

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini, peserta Program Magister Ilmu Biomedik  
FKUI:

Nama : Yuni Rukminiati

NPM : 0606 000 270

Kekhususan : Mikrobiologi

Dengan ini menyatakan bahwa Tesis saya yang berjudul “Uji Kepekaan Obat  
Antituberkulosis Lini Kedua Menggunakan Media Löwenstein Jensen dan  
BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tubes* (MGIT) 960” :

- a. Disusun dan diselesaikan oleh saya sendiri.
- b. Bukan merupakan salinan sebagian atau seluruh tesis/disertasi, karya tulis  
atau jurnal ilmiah yang pernah disusun orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya. Saya memahami dan  
menyadari bahwa apabila dikemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar  
maka kelulusan dan ijazah yang telah diterbitkan dapat dibatalkan.

Jakarta, 2 Juli 2009



Yuni Rukminiati

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Yuni Rukminiati  
NPM : 0606 000 270  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Uji Kepekaan Obat Antituberkulosis Lini Kedua Menggunakan Media Lowenstein Jensen dan BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tubes* (MGIT) 960

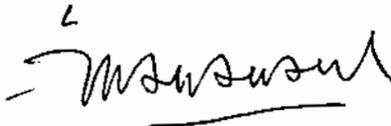
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk meraih gelar sarjana Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Anis Karuniawati, Ph.D, Sp.MK (.....)  
Pembimbing : dr. Retno Kadarsih, Sp.MK (.....)  
Penguji : dr. T. Mirawati Sudiro, Ph. D (.....)  
Penguji : dr. Elisna Syahrudin, Ph.D (.....)  
Penguji : Prof. Dr.dr. Purwastyastuti, MSc. Sp.FK (.....)

Ditetapkan di : Jakarta  
Tanggal : 2 Juli 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr. rer physiol. dr. Septelia Wanandi, MS

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas segala berkat dan kasih karunia-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari banyak pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Anis Karuniawati, Ph.D, Sp.MK selaku Pembimbing I dan dr. Retno Kadarsih, Sp.MK, selaku Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, pikiran dan nasehat untuk mengarahkan saya selama masa studi dan dalam penyiapan penelitian sampai penyusunan tesis ini;
2. dr. T. Mirawati Sudiro, Ph.D selaku Penguji I, dr. Elisna Syahrudin, Ph.D selaku Penguji II, dan Prof. Dr.dr. Purwastyastuti, M.Sc, Sp,FK selaku penguji III
3. Dr. rer.physiol. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik dan memberi kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu;
4. dr. Budiman Bela, Sp.MK selaku ketua kekhususan Mikrobiologi FKUI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di kekhususan Mikrobiologi;
5. dr. Anis Karuniawati, Ph.D., Sp.MK selaku ketua Departemen Mikrobiologi FKUI dan dr. Mardiasuti, M.Sc., Sp.MK selaku sekretaris Departemen Mikrobiologi FKUI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI;
6. Para pengajar di lingkungan Program Ilmu Biomedik dan Departemen Mikrobiologi FKUI atas bimbingannya selama perkuliahan;
7. dr Suryanto dari *Medical Research Unit* atas bimbingan statistiknya;
8. Orang tua (Bapak dan Ibu) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini, Adik-adik (Dwi dan Ventri);

9. Sahabat-sahabat saya, Fithri, Mbak Vivi, Mbak Ika, Lulut, Angel, Bu Yus, Mbak Deka, Mbak Febri, Yul, Mbak Gusti teman satu angkatan pada Program Ilmu Biomedik yang telah memberikan dukungan doa, semangat dan persahabatan;
10. Nuniek, Anthie, Erni, sahabat tercinta atas dukungan dan doanya untuk menyelesaikan perkuliahan.
11. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUI dan seluruh pegawai Departemen Mikrobiologi FKUI atas dukungan doa, kerjasama dan persahabatan selama ini serta sahabat lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala kerjasama, bantuan, nasehat, doa dan persahabatan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 2 Juli 2009

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yuni Rukminiati  
NPM : 06 06 000 270  
Kekhususan : Mikrobiologi  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Uji Kepekaan Obat Antituberkulosis Lini Kedua Menggunakan Media Löwenstein Jensen dan BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tubes* (MGIT 960)**

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta  
Pada tanggal: 2 Juli 2009  
Yang menyatakan



(Yuni Rukminiati)

## ABSTRAK

Nama : Yuni Rukminiati  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Uji Kepekaan obat antituberkulosis lini kedua menggunakan media Lowenstein Jensen dan BACTEC MGIT 960.

Penyebaran *Multidrug Resisten Tuberculosis* (MDR TB) yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan perhatian untuk program penanganan TB. Obat antituberkulosis lini kedua digunakan untuk pengobatan penderita MDR TB. Kami melakukan penelitian tentang Uji kepekaan obat antituberkulosis lini kedua menggunakan media Lowenstein Jensen dibandingkan dengan *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT 960) sistem. Tiga puluh (30) isolat bakteri MDR TB di uji dengan ofloksasin, amikasin, dan kanamisin menggunakan MGIT 960 dan hasilnya dibandingkan dengan metode proporsi pada media Lowenstein Jensen. Dari hasil penelitian didapat 27 isolat (90 %) sensitif terhadap ofloksasin , 21 isolat (70 %) sensitif terhadap amikasin dan 26 isolat (86,6 %) sensitif terhadap kanamisin. Dua isolat merupakan *Extensively Drugs Resistance (XDR TB)*. Waktu untuk uji kepekaan dengan MGIT adalah 9 hari sedangkan dengan metode proporsi 21 hari.

Kata Kunci :

Tuberkulosis, MDR-TB, obat antituberkulosis

## ABSTRACT

Nama : Yuni Rukminiati  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Susceptibility testing of Mycobacterium Tuberculosis to second line drugs by use of Lowenstein Jensen Media and Mycobacterium Growth Indicator Tube System (MGIT) 960

*The emergence of Multidrug resistant tuberculosis (MDR TB) caused by Mycobacterium tuberculosis is real threat for TB control program. Second line drugs was using for person who has MDR TB. The objective of this study was to evaluate the proportion method for testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to second line drugs compared to the Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT 960 )System. Thirty MDR TB isolates were tested for susceptibility to ofloxacin, amikasicin, and kanamycin by MGIT 960, and the result were compared to those obtain with proportion method on Lowenstein Jensen media, considered a reference method. Result for ofloxacin were 27 isolate (90 %) sensitive, 21 isolate (70 %) sensitive to amikacin and 26 isolate (86,6 %) sensitive to kanamycin. Two isolate were Extensively Drug resistance (XDR TB). The time required to obtain result was an average of 9 days by the MGIT and 21 days by the reference method.*

*Keyword :  
Tuberculosis, second line drugs, Mutidrugs resistant Tuberculosis (MDR TB)*

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	v
ABSTRAK .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1. Pendahuluan.....	5
2.2. Mycobacterium.....	5
2.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	
2.2.1.1 Karakteristik .....	7
2.2.1.2 Transmisi .....	7
2.2.1.3 Patogenesis .....	7
2.3. Resistensi <i>M. tuberculosis</i> terhadap obat antituberkulosis .....	9
2.3.1 Faktor yang mempengaruhi resistensi .....	9
2.4 Obat Antituberkulosis .....	11
2.4.1 MDR TB (Multidrug Resistance Tuberculosis) .....	16
2.4.2 XDR TB ( Extensively Drugs Resistance Tuberculosis) .....	17
2.5 Pemeriksaan Mikrobiologi <i>M. Tuberculosis</i> .....	18
2.5.1 Metode Uji kepekaan Obat.....	19
2.5.1.1 Metode Proporsi .....	19
2.5.1.2 Metode Konsentrasi absolut .....	20

2.5.1.3 Metode Rasio .....	21
2.5.1.4 Metode Komersial .....	21
3. BAHAN DAN CARA KERJA .....	23
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.2. Strategi Penelitian.....	23
3.3. Bahan dan Cara Kerja.....	23
3.4 Cara Kerja .....	25
3.4.1. Persiapan uji lini pertama.....	25
3.4.1.1. Isolat bakteri .....	25
3.4.1.2. Identifikasi <i>M. tuberculosis</i> .....	25
3.4.1.3 Persiapan obat antituberkulosis lini pertama .....	26
3.4.1.4 Pembuatan media Lowenstein Jensen (LJ) .....	27
3.4.1.5 Resistensi OAT menggunakan media LJ .....	27
3.4.1.6 MGIT 960 .....	28
3.5 Analisis Data .....	30
4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	31
4.1. HASIL .....	31
4.1.1 Uji Kepekaan OAT lini pertama .....	31
4.1.2 Uji Kepekaan OAT lini kedua .....	33
4.1.2.1 ofloksasin .....	34
4.1.2.2 amikasin .....	34
4.1.2.3 kanamisin.....	34
4.1.2.4 XDR TB.....	36
4.1.3 Pertumbuhan <i>M. tuberculosis</i> .....	36
4.2. PEMBAHASAN .....	36
4.2.1 Uji Kepekaan OAT lini pertama .....	37
4.2.2 Uji Kepekaan OAT lini kedua .....	38
4.2.2.1 ofloksasin .....	38
4.2.2.2 amikasin .....	39
4.2.2.3 kanamisin.....	40
4.2.2.4 XDR TB.....	40
4.1.3 Pertumbuhan <i>M. tuberculosis</i> .....	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN .....	44
DAFTAR REFERENSI .....	45
RIWAYAT HIDUP .....	48
LAMPIRAN .....	49
ARTIKEL .....	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. <i>M. tuberculosis</i> dengan pewarnaan tahan asam .....	6
Gambar 2.2 Struktur streptomisin .....	12
Gambar 2.3 Struktur rifampisin .....	12
Gambar 2.4 Struktur isoniazid .....	13
Gambar 2.5 Struktur etambutol .....	13
Gambar 2.6 Struktur molekul pirasinamid .....	14
Gambar 2.7 Struktur ofloksasin .....	15
Gambar 2.8 Struktur molekul kanamisin .....	15
Gambar 2.9 Prevalensi kasus MDR TB .....	16
Gambar 2.10 Peta penyebaran XDR TB di dunia tahun 2009 .....	17
Gambar 2.11 Tabung MGIT 960 .....	22

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Gen penyebab resistensi pada <i>M. Tuberculosis</i> .....	10
Tabel 2.2 Obat Antituberkulosis .....	11
Tabel 4.1. Hasil Uji kepekaan <i>M. Tuberculosis</i> terhadap OAT lini pertama menggunakan Lowenstein Jensen (LJ) .....	31
Tabel 4.2 Hasil Uji kepekaan <i>M. Tuberculosis</i> terhadap OAT lini pertama menggunakan BACTEC MGIT 960 .....	32
Tabel 4.3 Perbandingan hasil MDR TB menggunakan LJ dan BACTEC MGIT 960 .....	32
Tabel 4.4 Hasil kepekaan <i>M. tuberculosis</i> terhadap OAT lini kedua .....	33
Tabel 4.5 Sensitifitas dan spesifitas BACTEC MGIT 960 dibandingkan dengan Lowenstein Jensen .....	34
Tabel 4.6 Perbandingan hasil uji kepekaan OAT lini kedua .....	36
Tabel 4.7 Waktu pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36

## DAFTAR SINGKATAN



µg	= mikrogram
BTA	= Basil Tahan Asam
DOTS	= <i>Directly Observed Treatments Shortcourse</i>
INH	= Isoniazid
LJ	= Löwenstein Jensen
MDR-TB	= <i>Multidrug Resistance Tuberculosis</i>
MGIT	= <i>Mycobacterium Growth Indicator Tubes</i>
MIC	= <i>Minimum Inhibition Concentration</i>
OADC	= Oleic acid, Bovine albumin, dextrose, catalase)
OAT	= Obat Anti Tuberkulosis
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SIRE	= Streptomisin, Isoniazid, Rifampicin, Etambutol
TB	= Tuberkulosis
WHO	= <i>World Health Organization</i>
XDR-TB	= <i>Extensively Drug Resistance Tuberculosis</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penghitungan larutan kerja obat anti tuberkulosis lini kedua MGIT 960.

Lampiran 2. Hasil Uji Statistik

Lampiran 3. Hasil Uji Kepekaan Obat antituberkulosis lini pertama.

Lampiran 4. Hasil uji kepekaan obat antituberkulosis lini kedua .



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG

Tuberkulosis merupakan penyakit berbahaya ke-3 setelah penyakit jantung dan pernafasan akut yang menyebabkan kematian di dunia. Setiap tahunnya di dunia terdapat sekitar 8 juta penderita tuberkulosis paru dan sekitar 3 juta orang diantaranya meninggal akibat penyakit ini. Menurut WHO, pada tahun 2000 di kawasan Asia Tenggara diduga terdapat lebih dari 3,5 juta penderita tuberkulosis baru dan terjadi lebih dari 1,3 juta kematian akibat tuberkulosis.<sup>1</sup>

India, Cina dan Indonesia berkontribusi lebih dari 50% dari seluruh kasus tuberkulosis yang terjadi di 22 negara dan Indonesia menempati peringkat ke-3 terbanyak setelah India dan Cina.<sup>2</sup> Setiap tahunnya di Indonesia bertambah 250 ribu kasus baru dan terjadi sekitar 140.000 kematian akibat tuberkulosis. Sebagian besar penderita tuberkulosis adalah usia produktif (15-55 tahun).<sup>3</sup>

*Mycobacterium tuberculosis* ditularkan melalui udara yaitu melalui percikan dahak penderita tuberkulosis. Penderita tuberkulosis akan memercikan bakteri ke udara melalui batuk, bersin, berbicara atau meludah, dan seseorang dapat terinfeksi dengan tuberkulosis hanya dengan menghirup sejumlah kecil kuman tuberkulosis.<sup>3,4</sup> Penderita tuberkulosis dengan status tuberkulosis bakteri tahan asam (BTA) positif dapat menularkan kepada 10 -15 orang di sekitarnya.<sup>2</sup>

Penderita tuberkulosis dapat disembuhkan dengan minum obat anti tuberkulosis secara lengkap dan teratur. Obat anti tuberkulosis (OAT) seperti isoniazid, rifampisin, etambutol dan pirazinamid merupakan obat lini pertama yang relatif efektif dan murah. Jika penderita tuberkulosis tidak melakukan pengobatan secara teratur dan disiplin, mendapat obat yang tidak adekuat (baik dosis, kombinasi obat maupun lamanya pengobatan) maka dapat mengakibatkan terjadinya resistensi obat.<sup>4</sup>

Pada tahun 1990-an telah dilaporkan adanya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap dua obat penting dalam pengobatan tuberkulosis yaitu isoniazid dan rifampisin yang disebut *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB). Pengobatan pasien dengan MDR-TB dilakukan dengan pemberian OAT lini kedua seperti kapreomisin, amikasin, kanamisin, dan rifambutin yang membutuhkan biaya yang lebih mahal serta memberi efek samping lebih berat. Pengobatan dengan obat anti tuberkulosis lini kedua yang tidak tepat dapat mengakibatkan terjadinya *Extensively Drugs Resistance Tuberculosis* (XDR TB) yang didefinisikan sebagai resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin dan isoniazid yang merupakan obat anti tuberkulosis lini pertama paling efektif dan juga resisten terhadap antibiotik golongan fluorokuinolon serta setidaknya satu dari tiga obat lini kedua anti tuberkulosis, yaitu kapreomisin, kanamisin dan amikasin.<sup>5</sup>

Menurut WHO dari 17.690 isolat yang berasal dari 49 negara selama tahun 2000-2004, terdapat 20 % isolat diantaranya adalah MDR TB dan 2 % XDR TB. Pada isolat *M. tuberculosis* yang berasal dari Amerika Serikat (1993-2004) terdapat 4 % isolat MDR TB yang juga merupakan XDR TB. Sedangkan di Latvia (2000-2002) terdapat 19 % kasus MDR TB yang juga merupakan XDR TB dan di Korea Selatan (2004) terdapat 15 % kasus MDR TB yang merupakan juga XDR TB.<sup>6</sup>

Ketidaktepatan pengobatan MDR TB akan meningkatkan prevalensi XDR TB. Infeksi oleh XDR TB belum dapat disembuhkan dengan OAT yang ada saat ini sehingga dikhawatirkan penyebarannya dalam masyarakat dan meningkatkan tingkat kematian akibat tuberkulosis.

Laboratorium berperan penting dalam mengidentifikasi kasus MDR TB. Kecepatan dan keakuratan hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis lini kedua akan membantu klinisi membuat keputusan dalam pemilihan terapi obat dan membantu mencegah penyebaran MDR TB.

Metode proporsi menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ) merupakan metode baku emas yang membutuhkan waktu inkubasi yang lama (umumnya 21 hari semenjak kultur positif).<sup>7</sup> Oleh karena itu dibutuhkan uji

kepekaan yang lebih cepat dan akurat untuk mendeteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis lini kedua sebagai acuan pilihan pengobatan dan pencegahan penyebaran MDR TB dalam masyarakat.

BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) 960 merupakan sistem yang otomatis dengan kapasitas besar, dan tidak mengandung radioaktif. Sistem BACTEC MGIT 960 menggunakan tabung kultur yang berisi media Middlebrook 7H9 modifikasi dengan zat fluoresen yang tertanam pada bagian dasar tabung. Zat fluoresen tersebut sensitif terhadap penggunaan oksigen di dalam media sehingga akan memberikan sinyal positif bila terjadi pertumbuhan bakteri.<sup>8</sup> Kultur *M. tuberculosis* menggunakan media cair seperti pada sistem BACTEC MGIT 960 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih cepat dibandingkan dengan media padat. Pada media cair hanya dibutuhkan sekitar 15 hari setelah kultur positif untuk mendapatkan hasil uji kepekaan obat. WHO pada bulan Juni 2007 telah merekomendasikan penggunaan media cair untuk kultur dan uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT pada negara berkembang untuk menghadapi epidemi TB-HIV dan resistensi terhadap obat antituberkulosis.<sup>9</sup> Namun demikian, hingga kini belum terdapat standarisasi metode uji kepekaan menggunakan OAT lini kedua pada BACTEC MGIT 960 walaupun telah terbukti pada uji kepekaan menggunakan OAT lini pertama BACTEC MGIT 960 merupakan metode yang sensitif dan cepat. Pada penelitian ini akan dibandingkan uji kepekaan ofloksasin, amikasin, dan kanamisin sebagai OAT lini kedua menggunakan media Löwenstein Jensen dan BACTEC MGIT 960.

## 1.2 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum:

Mengetahui kinerja metode Löwenstein Jensen dan BACTEC MGIT 960 pada pengujian kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua di Laboratorium Mikrobiologi Klinik (LMK) FKUI.

Tujuan Khusus :

1. Mendapatkan hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua yaitu ofloksasin, amikasin, dan kanamisin menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ),
2. Mendapatkan hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua yaitu ofloksasin, amikasin, dan kanamisin menggunakan BACTEC MGIT 960,
3. Membandingkan hasil uji kepekaan MDR TB menggunakan media LJ dengan BACTEC MGIT 960.

## 1.3 MANFAAT PENELITIAN

1. Hasil optimasi uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap OAT lini kedua menggunakan medium Lowenstein Jensen dan BACTEC MGIT 960 dapat digunakan sebagai pemeriksaan rutin di laboratorium mikrobiologi klinik FKUI.
2. Pencegahan penyebaran MDR TB yang lebih luas.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pendahuluan

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>4</sup> Tuberkulosis merupakan penyebab kematian ketiga didunia setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernapasan akut, dan penyebab utama dari golongan penyakit infeksi. Bakteri ini dapat menginfeksi sepertiga populasi dunia, setiap detik ada satu orang yang terinfeksi tuberkulosis. Setiap tahunnya terdapat sekitar 8 juta penderita tuberkulosis paru, dan ada sekitar 3 juta orang meninggal akibat penyakit ini. Pada tahun 2000 di kawasan Asia Tenggara diduga terdapat lebih dari 3,5 juta penderita baru dan lebih dari 1,3 juta kematian akibat tuberkulosis.<sup>3</sup>

Tuberkulosis merupakan penyakit kronik dengan gejala batuk selama kurang lebih 3 minggu, demam, kehilangan berat badan, berkeringat di malam hari, dan seringkali disertai sputum berdarah.<sup>10</sup> Penderita tuberkulosis dapat menulari orang sekitarnya melalui percikan dahak pada saat batuk, bersin, berbicara, dan meludah.<sup>2</sup>

Seseorang yang tertular dengan bakteri tuberkulosis belum tentu menjadi sakit tuberkulosis karena bakteri tuberkulosis dapat menjadi tidak aktif (dorman) selama bertahun-tahun dengan membentuk suatu dinding sel berupa lapisan lilin yang tebal. Bila sistem kekebalan tubuh seseorang menurun, kemungkinan menjadi sakit tuberkulosis menjadi lebih besar.

### 2.2 Mycobacterium

Genus *Mycobacterium* merupakan bakteri aerob. *Myco* berasal dari bahasa latin yang berarti jamur atau lilin. Mikobakterium tidak mempunyai endospora ataupun kapsul dan digolongkan pada bakteri gram positif. Mikobakterium tumbuh sangat lambat, membutuhkan waktu satu bulan atau lebih sampai terbentuknya koloni yang terlihat. Pertumbuhan yang lambat sejalan dengan waktu dan energi yang dibutuhkan untuk membangun dinding sel yang tinggi akan konsentrasi rantai karbon yang disebut asam mikolat. Asam mikolat membuat sel resisten terhadap obat dan pewarnaan yang

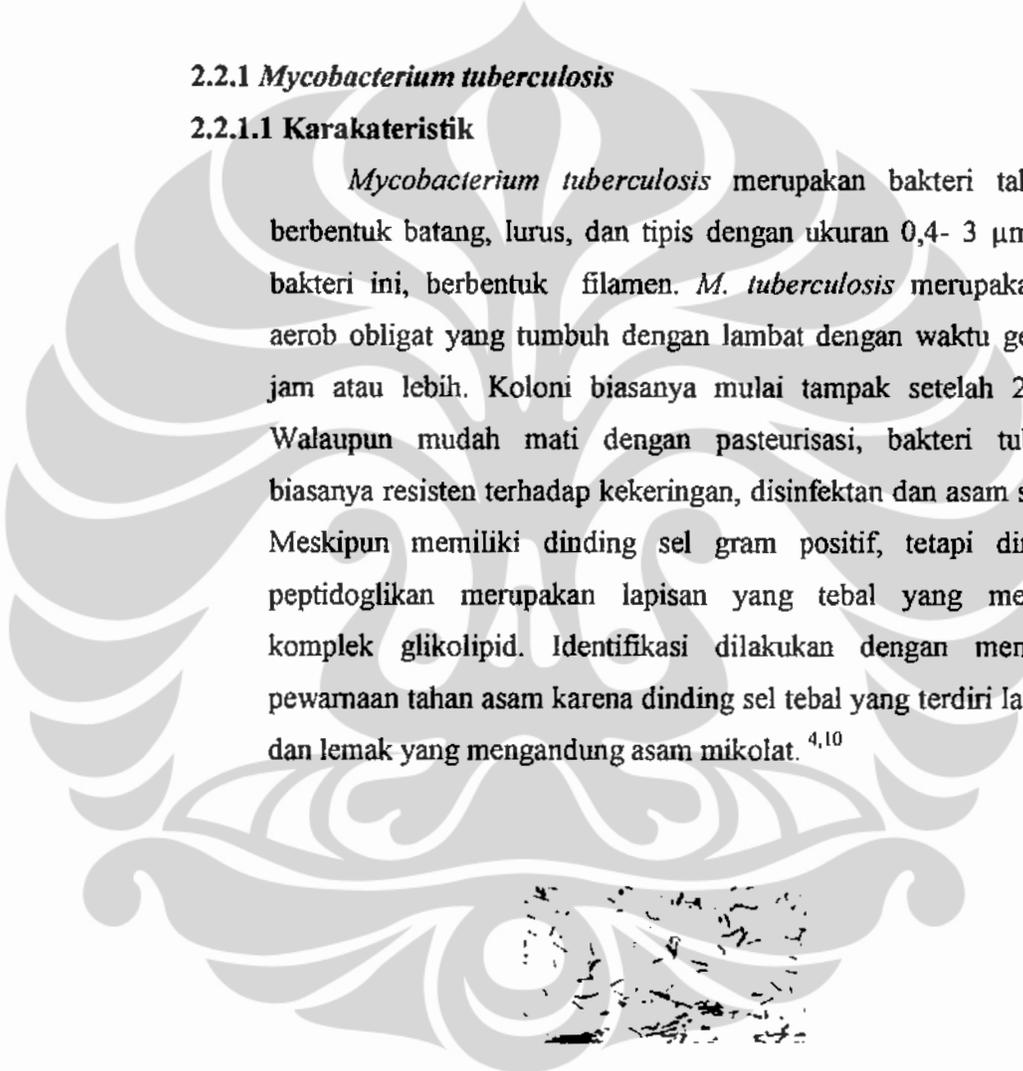
berdasarkan air. Mikobakterium dapat diwarnai dengan pewarnaan bakteri tahan asam.<sup>10</sup>

Beberapa Mikobakterium menggunakan ammonia atau asam amino sebagai sumber nitrogen serta gliserol sebagai sumber karbon. Temperatur optimum pertumbuhan sangat bervariasi, tergantung pada spesiesnya yaitu antara 25°C sampai 50°C.

## 2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

### 2.2.1.1 Karakteristik

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri tahan asam berbentuk batang, lurus, dan tipis dengan ukuran 0,4- 3 µm. In vitro bakteri ini, berbentuk filamen. *M. tuberculosis* merupakan bakteri aerob obligat yang tumbuh dengan lambat dengan waktu generasi 12 jam atau lebih. Koloni biasanya mulai tampak setelah 2 minggu. Walaupun mudah mati dengan pasteurisasi, bakteri tuberkulosis biasanya resisten terhadap kekeringan, disinfektan dan asam serta basa. Meskipun memiliki dinding sel gram positif, tetapi dinding sel peptidoglikan merupakan lapisan yang tebal yang mengandung kompleks glikolipid. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan tahan asam karena dinding sel tebal yang terdiri lapisan lilin dan lemak yang mengandung asam mikolat.<sup>4,10</sup>



Gambar 2.1. *M. tuberculosis* dengan pewarnaan tahan asam

### 2.2.1.2 Transmisi

Sumber penularan tuberkulosis adalah penderita yang dahaknya mengandung basil tahan asam (BTA (+)). Infeksi oleh bakteri ini paling sering disebarkan melalui udara (*air borne, droplets infection*). Partikel

udara berisi percikan dahak yang mengandung basil tahan asam berasal dari penderita saat batuk, bersin, tertawa, bernyanyi atau bicara. Partikel udara berukuran diameter 1-5  $\mu\text{m}$  dan mengandung basil tahan asam akan terhisap oleh orang sehat dan dapat menimbulkan penyakit tuberkulosis.

Kurang lebih 30% dari orang dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) seronegatif yang terpapar tuberkulosis akan terinfeksi, 5% pasien dengan infeksi laten akan berkembang menjadi aktif dalam waktu 2 tahun serta 5% lagi akan berkembang menjadi aktif setelah 2 tahun. Angka terjadinya perkembangan penyakit tuberkulosis ke arah yang aktif meningkat pesat pada pasien ko-infeksi dengan HIV. Penyebaran TB tergantung beberapa hal seperti jumlah orang yang terinfeksi dan orang yang berpotensi tinggi terinfeksi pada suatu wilayah, berada dalam satu ruangan yang sama dengan orang yang terinfeksi dalam jangka waktu lama dan sirkulasi udara dalam ruangan tersebut buruk.

### 2.1.2.3 Patogenesis

*M. tuberculosis* biasanya memasuki alveolar manusia melalui droplet aerosol. Hanya 5 % dari orang yang terpapar *M. tuberculosis* berkembang menjadi penyakit, dan 50% diantaranya akan menyebabkan kematian jika pasien tidak diobati. Ketika memasuki tubuh, bakteri pertama kali akan kontak dengan makrofag. Sel dendritik juga berperan penting pada tahap awal ini, karena sel dendritik diketahui dapat mempresentasikan antigen lebih baik daripada makrofag. Namun demikian, sel ini mungkin juga berperan penting dalam penyebaran *M. tuberculosis* didalam tubuh akibat kemampuannya bermigrasi.<sup>11</sup>

Makrofag di dalam paru, melalui produksi *chemokine* akan menarik monosit, limfosit, dan neutrofil inaktif, tapi tidak ada yang membunuh bakteri dengan sangat efisien. Kemudian akan terbentuk lesi fokal *granulomatous* yang terdiri dari *giant cell* yang berasal dari makrofag dan limfosit. Proses ini secara umum mempunyai arti penting dalam penyebaran bakteri. Sejalan dengan perkembangan respon imun

seluler, makrofag yang berisi bakteri akan mati, dan menghasilkan pembentukan pusat *caseous* dari granuloma yang dikelilingi oleh zona seluler yang terdiri dari fibroblas, limfosit, dan monosit. Walaupun *M. tuberculosis* diperkirakan tidak dapat memperbanyak diri di dalam jaringan *caseous* ini, tetapi karena pH-nya yang asam, rendahnya persediaan oksigen, dan adanya asam lemak yang beracun, beberapa *M. tuberculosis* dapat hidup dorman puluhan tahun. Kekuatan respon imun selular akan menentukan infeksi menetap pada tahap ini atau berlanjut. Infeksi tertutup ini berhubungan dengan infeksi TB laten atau persisten yang dapat bertahan sepanjang hidup seseorang tanpa gejala dan tidak menular. Pada orang yang mempunyai respon imun seluler yang efisien, infeksi akan bertahan pada tahap ini. Granulomatous dapat sembuh, menyisakan lesi fibrous atau kalsifikasi yang kecil. Tetapi jika orang yang terinfeksi tersebut tidak dapat mengatasi infeksi parunya pada tahap awal, atau orang dengan infeksi laten mengalami penurunan sistem imun, seperti akibat pemakaian obat-obat immunosupresif, infeksi HIV, umur, malnutrisi, atau karena faktor lainnya, maka pusat granuloma akan mencair melalui mekanisme yang tidak diketahui, dan akan menyediakan medium yang kaya sehingga bakteri dapat memperbanyak diri dalam waktu yang cepat. Pada keadaan ini, *M. tuberculosis* dapat melepaskan diri dari granuloma dan menyebar di paru (menyebabkan TB aktif) atau bahkan ke jaringan lain, melalui darah atau sistem limfatik (terjadi TB miliar dan ektrapulmonar). Jika hal ini terjadi maka orang tersebut menjadi infeksius dan memerlukan terapi antibiotik.

Sampai saat ini, hanya terdapat sedikit informasi yang sedikit mengenai respon *M. tuberculosis* terhadap lingkungan di dalam paru, hal ini menghambat perkembangan pengetahuan untuk mengatasi infeksi laten dan aktif ini. Tidak diketahui dengan jelas pada infeksi kronik bakteri tetap hidup tapi tidak tumbuh, yaitu keadaan yang benar-benar laten, atau tumbuh dan mati dalam jumlah yang sama. Fakta bahwa *M. tuberculosis* pada infeksi kronik dari tikus percobaan peka terhadap isoniazid (INH), obat yang hanya bekerja pada *M. tuberculosis* yang

bertumbuh, membuktikan bahwa yang terjadi adalah keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian bakteri.

### 2.3 Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Obat Antituberkulosis

Resistensi dapat terjadi karena 2 hal, yaitu :

#### 1. Resistensi obat primer

Resistensi yang terjadi pada pasien yang terinfeksi oleh strain bakteri yang secara genetik strain tersebut sudah resisten. Resistensi terjadi pada saat pasien belum mendapatkan pengobatan antituberkulosis sebelumnya.

#### 2. Resistensi obat sekunder

Resistensi yang muncul pada strain sensitif yang menginfeksi pasien karena pengobatan yang tidak adekuat atau gagal.

Resistensi terhadap obat anti tuberkulosis yang terjadi di masyarakat merupakan fenomena buruknya penanganan tuberkulosis. Hal ini dapat terjadi karena kesalahan penggunaan OAT seperti pengobatan yang tidak lengkap, salah penanganan, dosis obat yang salah, kesalahan uji kepekaan OAT dan pemakaian OAT dengan mutu rendah.<sup>12</sup> Tuberkulosis umumnya diobati selama 6 bulan dengan OAT lini pertama. OAT lini pertama merupakan pilihan utama dalam pengobatan karena aman, tidak mahal dan efektif. Jika pasien penderita TB tidak benar atau tidak lengkap pengobatannya maka resistensi strain *M. tuberculosis* dapat meningkat. Pada negara berkembang hanya 23 % kasus TB yang mendapat pengobatan dengan tepat.<sup>13</sup>

#### 2.3.1 Faktor yang mempengaruhi resistensi

Resistensi OAT pada *M. tuberculosis* disebabkan karena terjadinya mutasi pada kromosom bakteri. Mutasi terjadi secara spontan bahkan dapat terjadi sebelum adanya kontak dengan obat antituberkulosis. Terjadinya resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT dapat ditinjau dari faktor bakteri, manusia dan lingkungan.

##### 1. Bakteri

*M. tuberculosis* merupakan bakteri yang tahan asam dan membutuhkan waktu 14-20 jam untuk membelah diri. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT pertama kali dilaporkan oleh Daniel pada

tahun 1970 dan resistensi timbul karena mutasi kromosom secara spontan dan acak. Didapatkan perbandingan mutan *M. tuberculosis* yang resisten dengan jumlah *M. tuberculosis* keseluruhan adalah 1: 10<sup>6</sup> untuk INH dan streptomisin, 1: 10<sup>8</sup> untuk rifampisin dan 1: 10<sup>5</sup> untuk ethambutol. Hal ini berarti terdapat satu *M. tuberculosis* mutan yang resisten terhadap isoniazid dalam suatu populasi *M. tuberculosis* yang berjumlah 10<sup>6</sup> bakteri.

Tabel 2.1 Gen penyebab resistensi pada *M. tuberculosis*

Table. Gene loci involved in conferring drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Drug	Gene	Product	Reported frequency in resistant strains* (%)	Reference
Rifampicin	<i>rpoB</i>	β-subunit of RNA polymerase	>95	45-48,68-71
Isoniazid	<i>katG</i>	Catalase-peroxidase	80-70	39-48
	<i>oxyR-ahpC</i>	Alky hydro-reductase	~20	38
INH-Ethionamide	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	<10	40-48
Streptomycin	<i>rpsL</i>	Ribosomal protein S12	60	40-48
	<i>rrs</i>	16s rRNA	<10	113-117
Fluoroquinolone	<i>gyrA</i>	DNA gyrase	>90	107
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	Amidase	70-100	92-94
Ethambutol	<i>embCAB</i>	EmbCAB	89	88

\*Mutation frequencies are as determined by sequencing and polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis.

Sumber : *Emerging Infectious Disease, Vol.4, No.2, Apr-Jun 1998*

## 2. Manusia

Penderita tuberkulosis yang tidak mendapat pengobatan dapat menularkan penyakit ini kepada orang lain. Oleh karena itu penderita tuberkulosis harus mendapatkan pengobatan dengan tepat sampai sembuh. Pengobatan tuberkulosis yang memakan waktu lama (6 bulan) menyebabkan tingkat kepatuhan penderita dalam mengkonsumsi obat rendah sehingga diperlukan penatalaksanaan pengobatan yang baik oleh petugas kesehatan seperti adanya program DOTS (*Directly Observation Treatments*).

Ketidakpatuhan penderita TB meminum obat dapat menyebabkan kegagalan pengobatan dan juga terjadinya kekebalan bakteri terhadap OAT. Bila terjadi resistensi maka penanggulangan penyakit tuberkulosis menjadi lebih sulit dan mahal. Di Indonesia,

proporsi penderita yang tidak patuh obat dari tahun 1990 sampai 1995 mencapai 30%.

### 3. Lingkungan

Tuberkulosis penyebarannya melalui udara sehingga transmisi mudah sekali terjadi terutama di lingkungan yang padat penduduknya serta sosial ekonomi yang rendah.

## 2.4 Obat antituberkulosis

Pengobatan penderita TB merupakan cara untuk mengendalikan penyebaran TB di masyarakat karena belum adanya vaksin yang dapat memberikan perlindungan tinggi terhadap TB. Vaksin BCG memberi perlindungan yang cukup untuk mencegah TB meningeal tetapi sangat kurang untuk TB paru.

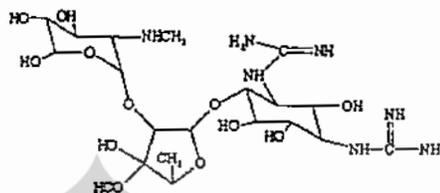
Pengobatan tuberkulosis dilakukan dengan pemberian antibiotik yang dapat membunuh bakteri *M. tuberculosis*. Struktur dinding sel mikobakterium yang terdiri atas asam mikolat menyebabkan sulitnya pengobatan dengan antibiotik. Selain itu akibat pertumbuhannya lambat maka pengobatan dengan terapi antibiotik membutuhkan waktu yang cukup lama. Terapi yang lama dapat menyebabkan terjadinya mutasi titik pada kromosom bakteri yang mengakibatkan perubahan target antibiotik. Untuk mencegah terjadinya resistensi terhadap obat antituberkulosis (OAT) maka digunakan kombinasi OAT sebagai terapi. Bila OAT digunakan secara tunggal maka resistensi terjadi dengan cepat. Dua obat utama yang digunakan yaitu isoniazid dan rifampisin. OAT lini pertama lainnya yaitu streptomisin, etambutol dan pirasinamid.

Tabel 2.2 Obat anti Tuberkulosis

Obat lini Pertama	Obat lini Kedua
1. Isoniazid (INH)	1. Kanamycin/amikacin
2. Ripampicin	2. Fluoroquinolone
3. Pyrazinamide	3. Cycloserine
4. ethambutol	4. Ethionamide
5. Streptomycin	5. Capreomycin
	6. P-amino-salicylic acid

## 1. Obat antituberkulosis lini pertama

### a. Streptomisin

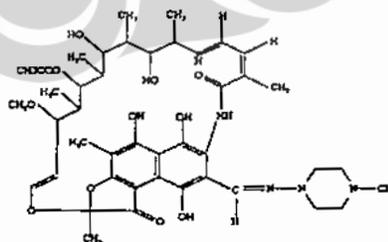


Gambar 2.2 Struktur Streptomisin<sup>13</sup>

Streptomisin merupakan golongan aminoglikosida yang diisolasi dari *Streptomyces mediterranei*. Streptomisin adalah antibiotik pertama yang digunakan untuk mengatasi tuberkulosis tetapi mempunyai toksisitas yang tinggi. Streptomisin berperan dalam mengikat ribosom 30S untuk menghambat translasi mRNA sehingga tidak terjadi sintesis protein.<sup>15</sup> Resistensi terhadap streptomisin terjadi karena mutasi pada gen 16S rRNA atau gen *rpsL*.

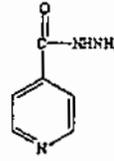
### b. Rifampisin

Rifampisin berperan untuk menghambat sintesis mRNA dengan cara berikatan dengan DNA-dependent RNA polymerase. Perubahan subunit  $\beta$  dari enzim ini dipengaruhi oleh mutasi pada gen *rpoB* yang merupakan gen *conserve*. Mutasi terjadi dengan cara mutasi titik atau delesi maupun insersi pada regio 81 bp di kodon 507-533 gen *rpoB*. Rifampisin diberikan secara oral dan didistribusikan dengan baik di dalam tubuh. Nilai MIC rifampisin yaitu 0.1  $\mu\text{g}$  to 0.2  $\mu\text{g}$ .



Gambar 2.3. Struktur Rifampisin<sup>13</sup>

## c. Isoniazid

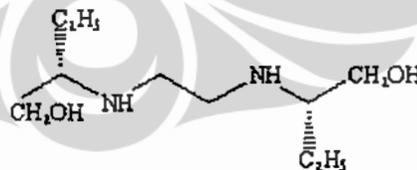
Gambar 2.4. Struktur Isoniazid<sup>13</sup>

Senyawa asam isonicotianat hidrazid yang sangat berpotensi dalam membunuh *M. tuberculosis complex*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, dan *M. microti*). Isoniazid mempunyai MIC yang sangat rendah (0.02 µg/ml to 0.06 µg/ml).

Isoniazid merupakan bakteriosida yang berperan dalam menghambat sintesis asam mikolat. Resistensi terhadap isoniazid berhubungan dengan mutasi pada *katG* kodon 315 yaitu gen yang mengkode enzim katalase peroksida. Mutasi menyebabkan enzim kehilangan kemampuan peroksidasi dan kapasitasnya mengaktivasi isoniazid.

Mutasi yang menyebabkan *M. tuberculosis* resisten terhadap isoniazid terletak pada beberapa gen dan region, 50%-90% strain resisten INH mempunyai mutasi pada kodon 315 dari gen *katG*, 20-30% pada region regulator *inhA*, dan 10-15% pada region intergenik *ahpC-oxyR*.<sup>15</sup>

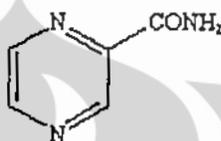
## d. Etambutol

Gambar 2.5. Struktur Etambutol<sup>13</sup>

Ditemukan tahun 1960, etambutol menghambat sintesis molekul tetapi tidak membunuh bakteri dengan cara menghambat polimerisasi arabinoglikan, salah satu penyusun dinding sel bakteri. Resistensi

terjadi dengan cepat jika digunakan sebagai obat tunggal sehingga harus dikombinasikan dengan obat anti TB lainnya. Etambutol juga dapat menimbulkan efek samping pada optic neuritis. Resistensi terjadi karena mutasi pada gen *embB*.

e. Pirasinamid



Gambar 2.6. Struktur molekul Pirasinamid

Pirasinamid berperan dalam menghambat metabolisme bakteri. Keuntungan dari pirasinamid yaitu masa terapi yang singkat, lebih berpotensi pada pH rendah dan bekerja intraseluler. Efek samping pirasinamid yaitu dapat menyebabkan kerusakan organ hati. Resistensi terjadi melalui Pzase atau efflux pump asam pirizinoat.

2. Obat Antituberkulosis lini kedua

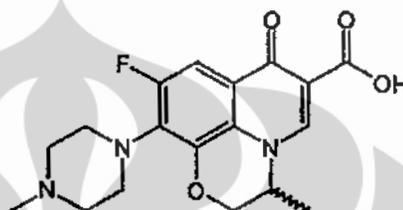
Ketika obat lini pertama tidak lagi efektif untuk mengobati tuberkulosis maka digunakan OAT lini kedua yang relatif lebih mahal dan lebih memberi efek samping lebih berat pada terhadap penderita tuberkulosis. OAT lini kedua yaitu :

a. Fluorokuinolon

Fluorokuinolon menghambat topoisomerase II (DNA gyrase) dan topoisomerase IV. Fluorokuinolon mempunyai kemampuan masuk ke dalam makrofag dan memberikan efek bakterisidanya di dalam sel tersebut. Efek samping fluorokuinolon yaitu gangguan saluran pencernaan, efek neurologik, *artopathy* dan fotosensitifitas. Ofloksasin and siprofloksasin adalah fuorokuinolon generasi pertama yang telah diterima WHO dan *Centers for Disease Control (CDC)* dan sebagai OAT lini kedua untuk mengatasi MDR TB. Pada beberapa kasus, ofloksasin diberikan dengan dosis satu kali sehari sebanyak 400 mg dan siprofloksasin diberikan dua kali sehari dengan

dosis 500– 750 mg. Meskipun demikian dapat juga diberikan dalam dosis tinggi yaitu 800 mg untuk ofloksasin dan 1000 mg untuk siprofloksasin, kedua satu kali dalam sehari.

Ofloksasin pertama kali dipatenkan pada tahun 1982. Ofloksasin dapat menghambat kerja DNA gyrase sehingga pembelahan sel bakteri terhambat.<sup>14</sup>

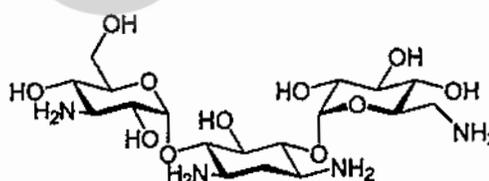


Gambar 2.7. Struktur molekul ofloksasin

#### b. Aminoglikosida

Aminoglikosida berperan dalam menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom 30S. Kanamisin diisolasi dari bakteri *Streptomyces kanamyceticus*. Efek samping penggunaan kanamisin yaitu gangguan pendengaran, toksik terhadap ginjal dan dapat menimbulkan reaksi alergi obat.

Pada penggunaan secara klinis amikasin lebih tidak menyebabkan vestibulotoxic and nephrotoxic daripada streptomisin dan kanamisin sehingga dapat digunakan untuk pengobatan dalam jangka waktu lama. Sementara itu bakteri yang resisten terhadap amikasin juga resisten terhadap streptomisin. Walaupun kapreomisin sangat mahal tetapi berpotensi dalam mematikan strain yang resisten terhadap streptomisin.



Gambar 2.8. Struktur molekul kanamisin

c. Ethionamide

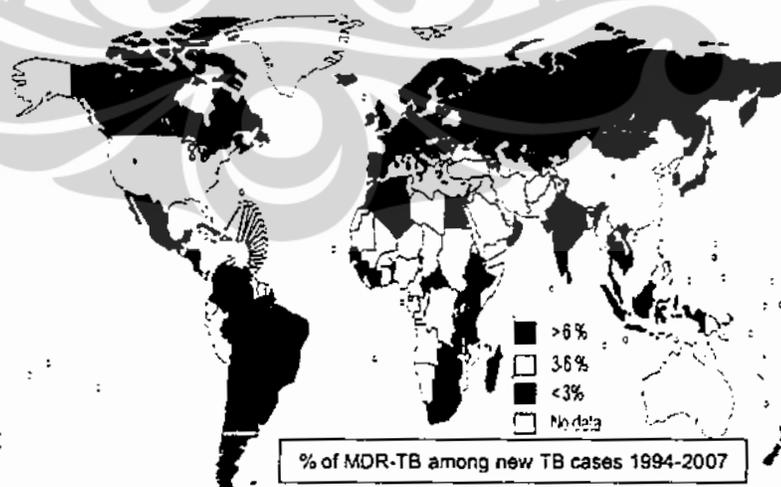
Setelah penemuan isoniazid kemudian ditemukan ethionamide dan prothionamide. Ethionamide mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan isoniazid, yaitu menghambat sintesis asam mikolat. Secara *in vitro* kedua turunan pyridine bersifat bakterisida tetapi resistensinya mudah terjadi. Efek samping dari penggunaan ethionamide yaitu gangguan pada saluran cerna, hepatotoksitas (4,3 % penderita).

d. Cycloserine

Cycloserine berperan dalam menghambat dinding sel. Pada penelitian yang dilakukan tahun 1950an, cycloserine memberikan efektifitas yang rendah dibandingkan dengan PAS.

#### 2.4.1 MDR TB (*Multidrug Resistance Tuberculosis*)

MDR-TB merupakan resistensi *M. tuberculosis* terhadap setidaknya 2 obat tuberkulosis lini pertama yaitu rifampisin dan isoniazid yang merupakan dua OAT paling penting dalam pengobatan tuberkulosis. Isoniazid merupakan OAT yang mempunyai aktifitas bakterisida paling kuat sedangkan rifampisin merupakan OAT yang berperan dalam membunuh bakteri yang sedang tidak dalam fase replikasi.<sup>12</sup> Isoniazid dan rifampisin dapat membunuh lebih dari 99% bacilli dalam 2 bulan sejak awal terapi.



Gambar 2.9 Prevalensi kasus MDR TB<sup>16</sup>

WHO memperkirakan terjadi 500.000 kasus MDR-TB dengan tingkat kematian 110 .000 orang setiap tahunnya dan 5 persen dari 9 juta kasus merupakan kasus tuberkulosis baru.<sup>16,17,18</sup>

Tuberkulosis ditangani menggunakan obat tuberkulosis lini pertama selama 6 bulan berturut-turut. Pengobatan bagi penderita MDR-TB sangat sulit karena memerlukan waktu yang lebih lama yaitu 2 tahun dan obat lini kedua lebih toksik serta memerlukan biaya 100 kali lebih mahal daripada pengobatan dengan OAT lini pertama.

Dalam 1 tahun satu kasus MDR TB dapat menularkan pada enam orang yang lain. Sehingga jika kasus tersebut tidak disembuhkan akan timbul 30 kasus baru dalam lima tahun.<sup>20</sup>

MDR TB sudah dikonfirmasi keberadaannya di Indonesia sehingga untuk menghambat meningkatnya kasus MDR TB maka program DOTS harus dilaksanakan sebaik-baiknya.

#### 2.4.2 Extensively Drugs Resistance Tuberculosis (XDR TB)

Countries that had reported at least one XDR-TB case by end March 2009



Argentina	Canada	Chad	China	India	Madagascar	Philippines	Russian Federation	Ukraine
Australia	DR Congo	China HK	Colombia	Korea	Iran	Poland	Sri Lanka	USA and Territories
Austria	Cuba	Costa Rica	Czech Rep.	Latvia	Lebanon	Portugal	Sudan	Sri Lanka
Bangladesh	Denmark	France	DR Congo	Malawi	Nepal	Romania	Taiwan	USA and Territories
Brazil	Egypt	Germany	Guatemala	Mexico	Qatar	Republic of Korea	Thailand	USA and Territories
	Finland	Greece	Hong Kong SAR	Myanmar	South Africa	Republic of Moldova	Turkey	USA and Territories
		Hungary	Indonesia	Norway	Tanzania	Timor-Leste		
		Ireland	Japan	Paraguay	Togo			
		Italy	Kazakhstan	Turkmenistan				
		Kenya	Malaysia	Uzbekistan				
		Latvia	Mexico	Vietnam				
		Lithuania	Moldova					
		Madagascar	Myanmar					
		Malawi	Nepal					
		Malaysia	Philippines					
		Mexico	Poland					
		Moldova	Portugal					
		Monaco	Romania					
		Netherlands	Russian Federation					
		Norway	Sri Lanka					
		Paraguay	Taiwan					
		Peru	Thailand					
		Poland	Turkey					
		Portugal	Ukraine					
		Romania	USA and Territories					
		Russian Federation						
		Sri Lanka						
		Sudan						
		Taiwan						
		Thailand						
		Tanzania						
		Togo						
		Turkey						
		Ukraine						
		USA and Territories						
		Vietnam						

The boundaries and the names shown on this map do not imply the acceptance or recognition by WHO of any particular authority for the boundaries and the names shown. It is the responsibility of the user to verify the accuracy of the information shown on this map. © 2009 WHO. All rights reserved.

Gambar 2.10. Peta penyebaran XDR TB di dunia tahun 2009

*Extensively Drugs Resistance Tuberculosis (XDR TB)* dapat terjadi bila penggunaan obat anti TB lini kedua tidak tepat. XDR sulit diobati karena XDR TB resisten terhadap obat lini pertama dan kedua.

Pertama kali XDR TB dilaporkan di Kwazulu Natal pada awal tahun 2006.<sup>17</sup>

Pada 53 pasien yang dilaporkan menderita XDR TB, 44 pasien diantaranya adalah HIV positif dan 52 pasien meninggal 16 hari setelah spesimen sputum diambil.<sup>16</sup> Pada Maret 2006 CDC dan WHO menemukan kasus XDR TB pada 17 negara dan Oktober 2006 WHO mendefinisikan XDR TB sebagai *M. tuberculosis* yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin (atau MDR TB) yang juga resisten terhadap antibiotik golongan fluorokuinolon serta setidaknya satu dari 3 obat suntik yaitu kapreomisin, kanamisin, dan amikasin.<sup>18</sup> Hal ini menyebabkan XDR TB sulit ditangani dan telah terjadi di Amerika Serikat, Eropa Timur dan Afrika.

Selama November 2004-2005 CDC dan WHO melakukan survei uji resistensi obat. *Extensively Drugs Resistance Tuberculosis* (XDR TB) telah diidentifikasi terjadi pada semua negara, umumnya terjadi di Korea Selatan (n= 200; 15 % dari semua isolat MDR TB). Jumlah terjadinya XDR TB meningkat dari 14 (5 % dari isolat MDR TB) pada tahun 2000 menjadi 34 (7 % isolat MDR TB) pada tahun 2004. Peningkatan jumlah XDR TB ditemukan pada negara Eropa Timur atau Asia Barat (n=15 (3%) pada tahun 2000 menjadi n =11 (17%) pada tahun 2003).<sup>18</sup>

## 2.5 Pemeriksaan mikrobiologi *M.tuberculosis*

Pada saat ini, khususnya di negara berkembang, diagnosis TB paru bertumpu pada pemeriksaan mikroskopis dan kultur yang dilanjutkan dengan uji kepekaan terhadap OAT.

### 1. Pemeriksaan apusan mikroskopis langsung

Biasanya dilakukan 3 kali pemeriksaan spesimen dahak yaitu dua kali dahak pagi dan dahak sewaktu atau tiga kali dahak pagi yang diambil secara berturut-turut. Dahak pagi biasanya lebih sering memberikan hasil BTA (+) dibandingkan dahak sesaat. Pemeriksaan mikroskopis langsung

merupakan metode yang paling sederhana, cepat, terpercaya dan paling murah untuk diagnosis pasien TB.

## 2. Pemeriksaan kultur

Pemeriksaan kultur lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan pemeriksaan dahak secara mikroskopis. Melalui kultur, diferensiasi antara bakteri mati dan hidup dapat dilakukan. Kultur yang positif dapat dilanjutkan dengan uji kepekaan OAT sehingga dapat dijadikan acuan pengobatan yang lebih baik. Kultur dapat dilakukan pada media cair (Middlebrook 7H9) dan media padat (Lowenstein Jensen, Ogawa).

## 3. Uji kepekaan OAT

Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap obat bermanfaat bagi klinisi dalam mengarahkan jenis obat yang diberikan pada penderita TB. Terdapat banyak metode untuk melakukan uji kepekaan, misalnya dengan media padat atau cair, cara seluler ataupun cara molekuler. Semua metode mempunyai keunggulan dan kelemahan, karena itu apapun caranya yang terpenting adalah metode tersebut terstandarisasi.

## 4. Uji Diagnostik lain

Uji diagnostik tuberkulosis banyak tersedia di pasaran tetapi uji tersebut banyak yang belum terstandarisasi sehingga perlu kehati-hatian dalam penggunaannya. Uji tersebut diantaranya yaitu :

- a. Uji serologi untuk mengukur kadar antibodi terhadap mikobakteria. Kit yang tersedia untuk uji ini sensitifitasnya masih rendah sehingga pemakaiannya belum dianjurkan.
- b. Amplifikasi asam nukleat *M. tuberculosis* dari spesimen baik dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional, *realtime* PCR, maupun PCR isothermal.

### 2.5.1 Metode Uji Kepekaan Obat

#### 2.5.1.1 Metode Proporsi

Lowenstein Jensen (LJ) digunakan untuk isolasi dan kultur mikobakteria. LJ merupakan media selektif untuk mikobakteria terutama *M. tuberculosis*. Komposisi media LJ yaitu *malachite green*,

gliserol, asparagin, potato flour, telur, dan larutan garam mineral. Adanya *malachite green* berperan dalam menghambat pertumbuhan kontaminan dari bakteri lain. Penambahan telur membantu media menjadi padat.<sup>19,20</sup>

Uji kepekaan dapat dilakukan dengan metode proporsi menggunakan media LJ. Uji proporsi merupakan uji yang membandingkan pertumbuhan isolat *M. tuberculosis* pada media yang mengandung obat dengan bakteri kontrolnya. Pada uji kepekaan bakteri terhadap OAT lini pertama tingkat ketepatan metode proporsi telah terstandarisasi. Namun demikian hasil uji kepekaan bakteri terhadap OAT lini kedua menggunakan metode proporsi hingga saat ini masih belum memuaskan.

Jumlah koloni yang terdapat pada permukaan media LJ yang mengandung OAT menandakan jumlah bakteri resisten yang terdapat pada inokulum. Dengan membagi jumlah koloni pada permukaan media yang mengandung OAT dengan jumlah koloni pada media kontrol akan menghasilkan proporsi bakteri yang resisten untuk strain tersebut. Jika proporsi yang resisten terhadap obat tertentu dibawah 1 % maka strain tersebut dinyatakan sensitif. Jika proporsinya minimal 1 % maka dinyatakan resisten.

Metode proporsi =  $\frac{\text{jumlah koloni pada LJ dengan OAT}}{\text{Jumlah koloni pada LJ tanpa OAT}} \times 100 \%$

#### 2.5.1.2 Metode Konsentrasi absolut

Bakteri standar diinokulasikan pada media kontrol yang tanpa obat dan media yang mengandung beberapa tingkatan konsentrasi obat tertentu yang diuji. Metode ini dapat menentukan konsentrasi hambatan minimal (KHM) atau *minimum inhibitor concentration* (MIC), yaitu konsentrasi obat yang terendah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan.

### 2.5.1.3 Metode Rasio

Metode ini hampir sama dengan metode konsentrasi absolut yaitu menggunakan beberapa konsentrasi obat. Pada metode ini digunakan 2 set medium tanpa dan mengandung OAT untuk menguji strain *M. tuberculosis* yang diperiksa dan strain standar *M. tuberculosis* H37Rv. Hasil uji kepekaan diperlihatkan dengan rasio MIC obat yang menghambat pertumbuhan isolat *M. tuberculosis* dibagi dengan MIC *M. tuberculosis* H37Rv.

### 2.5.1.4 Sistem komersial

#### *Mycobacterium Growth Indicator Tubes (MGIT)*

BACTEC MGIT 960 merupakan metode untuk mendeteksi secara cepat mikobakterium secara cepat pada sampel klinis selain darah. Sistem ini sederhana, efisien dan aman untuk penggunaan di laboratorium dengan luas terbatas.

Tabung kultur mengandung media Middlebrook 7H9 modifikasi yang pada bagian bawahnya terdapat zat fluorescen yang tertanam dalam silikon sebagai indikator pertumbuhan. Suplemen pertumbuhan seperti Oleic acid, Bovine albumin, Dextrose, dan Catalase (OADC) ditambahkan kedalam tabung kultur untuk mempercepat pertumbuhan. Mikroorganisme yang ada di dalam kultur menggunakan nutrisi dan oksigen di dalam kultur untuk metabolisme. Sensor fluorescen akan merespon konsentrasi oksigen pada media kultur. Alat detektor didalam mesin MGIT menghitung tingkat fluorescen, yang berhubungan dengan konsumsi oksigen oleh bakteri yang tumbuh. Perubahan kadar oksigen di dalam medium akan memberikan sinyal positif pada mesin.

Sistem BACTEC MGIT 960 adalah suatu metode cepat yang secara kualitatif menguji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT (streptomisin, isoniazid, rifampisin, etambutol) pada konsentrasi kritis.

BACTEC MGIT 960 mempunyai suhu inkubasi 37°C dan dimonitor peningkatan fluoresennya setiap 60 menit. Uji kepekaan membutuhkan waktu inkubasi 4-13 hari. Uji ini berdasarkan pertumbuhan *M. tuberculosis* pada tabung yang mengandung obat dibandingkan dengan tabung tanpa obat (kontrol). Sinyal pada mesin BACTEC MGIT960 akan memberikan sinyal positif jika *Growth Unit* (GU) pada tabung kontrol mencapai 400. Jika GU pada tabung yang mengandung obat mencapai 100 maka isolat tersebut dikatakan resisten.



Gambar 10. Tabung MGIT 960

Keterangan gambar :

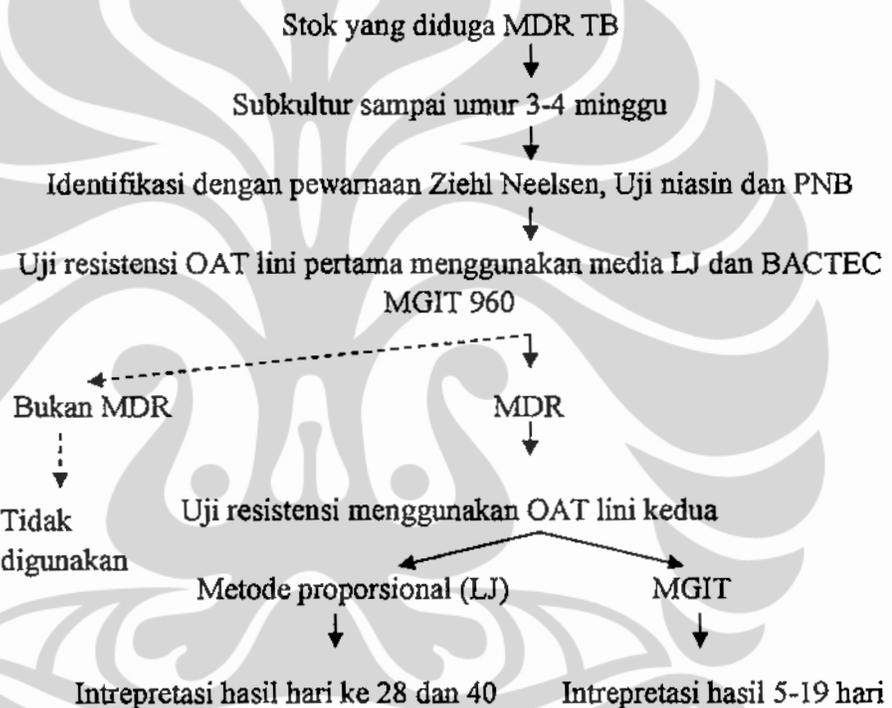
1. Silikon yang berisi fluorescen yang berperan sebagai indikator pertumbuhan
2. Bakteri yang mengkonsumsi O<sub>2</sub>

## BAB III BAHAN dan CARA KERJA

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Klinik (LMK) FKUI sejak bulan April 2008 hingga Mei 2009

### 3.2 Strategi Penelitian



### 3.3. Bahan

#### a. Isolat Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat koleksi Departemen mikrobiologi FKUI dari tahun 2005-2008.

Kontrol sensitif untuk penelitian ini digunakan *M. tuberculosis* H37Rv.

Kontrol resisten digunakan strain *M. tuberculosis* yang resisten amikasin/kanamisin (FK 18) dan ofloksasin (FK 1) yang keduanya berasal dari *WHO Supranational TB Reference Lab. Network* (IMVS Australia)

b. Jumlah Sampel

Perkiraan jumlah sampel menggunakan hasil penelitian Rinaldi, didapatkan proporsi resistensi terhadap ofloksasin sebesar 7,3 % dari kasus MDR.<sup>21</sup> Tingkat kemaknaan  $Z\alpha$  pada kurva normal 1,96 dan derajat kesalahan yang masih dapat diterima 10 %. Penghitungan jumlah sampel adalah sebagai berikut :

$$N = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2}$$

$$\alpha = 0,05 \quad Z\alpha = 1,96$$

$$P = 7,3 \% (0,073)$$

$$Q = 100 - P = 92,7 \% = 0,927$$

$$D = 10 \%$$

$$N = \frac{(1,96)^2 \times 0,073 \times 0,927}{0,1^2}$$

$$= 25,9$$

$$= 26 \text{ sampel}$$

Sedangkan jumlah sampel untuk amikasin menggunakan penelitian Balabanova yang melakukan penelitian tentang MDR TB di rusia, didapatkan proporsi resistensi terhadap amikasin sebesar 7,2 %.<sup>22</sup> Tingkat kemaknaan  $Z\alpha$  pada kurva normal 1,96 dan derajat kesalahan yang masih dapat diterima 10 %. Penghitungan jumlah sampel adalah sebagai berikut :

$$N = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2}$$

$$\alpha = 0,05 \quad Z\alpha = 1,96$$

$$P = 7,2 \% (0,072)$$

$$Q = 100 - P = 92,8 \% = 0,928$$

$$D = 10 \%$$

$$N = \frac{(1,96)^2 \times 0,072 \times 0,928}{0,1^2}$$

$$= 25,6$$

$$= 26 \text{ sampel}$$

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 sampel, tujuannya untuk ketepatan hasil penelitian.

c. Obat anti tuberkulosis

Obat antituberkulosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Uji resistensi lini pertama.
  - a. Streptomisin,
  - b. Isoniazid
  - c. Rifampisin
  - d. Etambutol
2. Uji resistensi lini kedua
  - a. Ofloksasin, Cat. O8757-1G, 100 µg/ml
  - b. Amikasin, Cat. A1774-1G, 710 µg/ml
  - c. Kanamisin, Cat. K1377-1G, 767 µg/mg

### 3.4 Cara Kerja

Semua prosedur dilakukan di Laboratorium dengan *Biosafety Laboratorium* (BSL) II plus. Tuberkulosis merupakan penyakit dengan penularan melalui udara, oleh karena itu dalam melakukan penelitian keselamatan peneliti harus diperhatikan. Semua prosedur kerja dilakukan di dalam *Biosafety Cabinet* (BSC) kelas II. Peneliti dilengkapi oleh perlengkapan laboratorium seperti jas lab, sarung tangan dan masker N95. Untuk meminimalisir penularan tuberkulosis semua sampah dan alat yang digunakan harus diautoklaf terlebih dahulu sebelum dibuang ataupun dicuci.

#### 3.4.1 Persiapan uji resistensi lini pertama

##### 3.4.1.1 Bakteri

Bakteri ditumbuhkan pada medium LJ. Uji kepekaan dilakukan pada bakteri yang berumur 3-4 minggu.

##### 3.4.1.2 Identifikasi *M. tuberculosis*

Setelah *M. tuberculosis* tumbuh pada media LJ dilakukan identifikasi untuk konfirmasi. Dilakukan pewarnaan basil tahan asam (BTA) dengan hasil positif jika terdapat bakteri tahan asam berbentuk batang berwarna merah secara mikroskopis. Uji niasin dilakukan untuk melihat ada tidaknya asam nikotinat yang dihasilkan semua spesies mikobakterium pada saat pertumbuhan. Sedangkan uji menggunakan media LJ yang mengandung PNB (Paranitro-Benzoic Acid) untuk mengetahui bahwa isolat yang tumbuh adalah *Mycobacterium tuberculosis*.

### 3.4.1.3 Persiapan obat anti tuberkulosis lini pertama

#### 1. Membuat larutan stok

Obat anti tuberkulosis diperoleh dari SIGMA. Setiap obat antituberkulosis mempunyai potensi tersendiri yang besarnya diketahui dari produsen obat. Untuk mendapatkan larutan stok obat maka digunakan rumus :

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Berat (mg)} \times \text{potensi } (\mu\text{g/ml})}{\text{Konsentrasi}}$$

#### 2. Membuat larutan kerja

Untuk menghitung konsentrasi akhir obat digunakan perhitungan

$$C_w = \frac{C_s \times V_s}{V_w}$$

$C_w$  = konsentrasi larutan akhir obat

$C_s$  = konsentrasi larutan stok obat

$V_s$  = volume stok

$V_w$  = Volume akhir yang akan digunakan

##### a. Obat lini pertama :

- Streptomisin (potensi 100 %), konsentrasi akhir 4  $\mu\text{g/ml}$  pelarut akuades steril
- Isoniazid (potensi 100 %), konsentrasi akhir 0,2  $\mu\text{g/ml}$  pelarut akuades steril
- Rifampisin (potensi 95 %), konsentrasi akhir 40  $\mu\text{g/ml}$  pelarut Dimetilformamide
- Etambutol (potensi 100 %), konsentrasi akhir 4  $\mu\text{g/ml}$  pelarut akuades steril

##### b. Obat lini kedua :

- Ofloksasin (potensi 100 %) konsentrasi akhir 2  $\mu\text{g/ml}$  pelarut 0,1 N NaOH
- Amikasin (potensi 71 %) konsentrasi akhir 40  $\mu\text{g/ml}$  pelarut akuades steril

- Kanamisin (potensi 76,7 %) konsentrasi akhir 30 µg/ml pelarut akuades steril

#### 3.4.1.4 Pembuatan media Lowenstein Jensen (LJ)

Dilarutkan 3,75 gram LJ medium base dalam 600 ml Akuades. Ditambahkan 12 ml gliserol kemudian dicampur hingga homogen lalu diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah proses sterilisasi selesai medium didinginkan pada suhu sekitar 50°C, kemudian ditambahkan 1000 ml homogenat telur steril dan dihomogenisasi. Untuk membuat media yang mengandung OAT disediakan 5 erlenmeyer steril dengan masing-masing erlenmeyer diisi 150 ml larutan media LJ. Pada masing masing erlenmeyer dimasukkan rifampisin (konsentrasi akhir 40 µg/ml), isoniazid (konsentrasi akhir 0,2 µg/ml), etambutol (konsentrasi akhir 4 µg/ml), streptomisin (konsentrasi akhir 4 µg/ml), dan PNB. Sisa media LJ sebanyak 850 digunakan sebagai kontrol medium tanpa obat. Selanjutnya medium dibagi ke dalam tabung atau botol steril masing-masing 7 ml. Pembentukan gelembung udara sedapat mungkin harus dihindari. Botol yang berisi media diletakkan pada inspirator dengan posisi miring dengan sudut kurang lebih 30°C. Inspirator diatur pada suhu 85°C selama 45 menit lalu didiamkan pada suhu kamar. Bila kualitas media tidak baik (berlubang atau terdapat gelembung pada permukaan media) maka media tersebut tidak dapat dipakai. Media dapat disimpan hingga 4 minggu pada suhu -20°C.

#### 3.4.1.5 Resistensi obat anti tuberkulosis menggunakan media LJ.

Prosedur uji kepekaan obat antituberkulosis terhadap *M. tuberculosis* sesuai dengan prosedur pemeriksaan yang telah ditetapkan oleh Depkes,<sup>20,25</sup> sedangkan konsentrasi obat berdasarkan panduan yang dikeluarkan WHO.<sup>24</sup>

##### a. Pembuatan suspensi bakteri

Diambil satu koloni bakteri dan dimasukkan dalam tabung yang telah mengandung beads dan tween80 0,1 %. Suspensi bakteri yang homogen dibuat menggunakan vorteks selama 1-2 menit, kemudian didiamkan 15 menit. Lalu suspensi ditambah akuades steril kurang

lebih 1 ml, divorteks, kemudian diamkan 15 menit sampai partikel kasar mengendap dan supernatan tampak jernih.

b. Pengenceran suspensi bakteri

Dibuat serial pengenceran sebanyak 5 tabung ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), masing-masing tabung diisi dengan 4,5 ml akuades steril. Diambil suspensi bakteri dan dimasukkan ke tabung berisi akuades 5 ml, sampai didapatkan kekeruhan yang setara dengan McFarland 0,5-1. Suspensi dengan kekeruhan McFarland 0,5-1 diambil sebanyak 0,5 ml kemudian dimasukkan ke tabung 1 dan dicampur menggunakan pipet sehingga dihasilkan larutan bakteri pengenceran  $10^{-1}$ . Suspensi dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil 0,5 ml kemudian dimasukkan ke tabung 2 dan dicampur menggunakan pipet sehingga dihasilkan larutan bakteri pengenceran  $10^{-2}$ . Demikian seterusnya sampai tabung ke-5 sehingga didapat tabung dengan pengenceran bakteri  $10^{-1} - 10^{-5}$ .

c. Inokulasi pada media tanpa OAT dan media dengan OAT

Disiapkan 2 botol media LJ tanpa OAT dan 2 botol media LJ dengan masing-masing mengandung OAT. Diambil 100  $\mu$ l suspensi bakteri dengan pengenceran  $10^{-3}$  dengan menggunakan pipet dan diinokulasi pada media LJ yang mengandung OAT dan tanpa OAT. Diambil 100  $\mu$ l suspensi bakteri dari tabung dengan pengenceran  $10^{-5}$  menggunakan pipet dan diinokulasi pada media LJ yang mengandung OAT dan tanpa OAT. Botol-botol ditutup tetapi tidak boleh terlalu rapat. Kemudian dibiarkan selama 1 hari dalam inkubator suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan posisi kemiringan  $30^{\circ}$ . Setelah inkubasi semalam, tutup botol dieratkan dan tegakkan posisi botol menjadi vertikal. Pembacaan pertumbuhan dilakukan pada hari ke-28 dan 40.

#### 3.4.1.6 BACTEC MGIT 960

Prosedur uji kepekaan dengan BACTEC MGIT 960 berdasarkan protokol yang telah ditetapkan oleh Departemen Mikrobiologi FKUI yang diadopsi

dari WHO *Supranational TB Reference Lab. Network* (IMVS, Australia).<sup>23,24</sup>

1. Preparasi antibiotik SIRE MGIT

Antibiotika Streptomisin (1 µg/ml), Isoniazid(0,1 µg/ml), Rifampisin (1 µg/ml), dan Etambutol (5 µg/ml) (SIRE) disediakan oleh Bactec Deckinson (BD). Pembuatan larutan kerja SIRE dilakukan dalam *biosafety cabinet* dan sesuai dengan panduan yang berasal dari BD. Tutup metal dari tiap antibiotika yang akan dilarutkan dibuka kemudian secara aseptik, dilarutkan dengan 4 ml akuades steril. Vial ditutup kembali dan dikocok hingga homogen. Antibiotik kemudian disimpan pada suhu - 20 °C.

2. Preparasi media antibiotik lini kedua

Antibiotik lini kedua yaitu ofloksasin (2 µg/ml), amikasin (1 µg/ml), dan kanamisin (5 µg/ml) berasal dari SIGMA-Aldrich. Adapun penghitungan antibiotik berdasarkan protokol dari *WHO Supranational TB Reference Lab. Network (IMVS Australia)* (Lampiran 1)

3. Preparasi uji kepekaan antibiotik dengan BACTEC MGIT 960

Semua prosedur dilakukan dalam *biosafety cabinet*. Disiapkan 5 tabung MGIT 7 ml untuk setiap 1 sampel. Kedalam setiap tabung dimasukkan 800 µg suplemen SIRE yang mengandung Middlebrok 7H9 (bovine albumin, dextrose, catalase, oleic acid[OADC; Becton Dickinson ]). Kemudian dimasukkan 100 µl antibiotika ke dalam tabung MGIT (1 tabung untuk 1 antibiotik).

4. Preparasi isolat *M. tuberculosis* dari LJ dan inokulasi pada tabung MGIT

Semua prosedur dilakukan dalam *biosafety cabinet*. Disiapkan 3 botol dengan masing-masing diberi tulisan HEAVY 1(H1), HEAVY 2(H2) dan LIGHT (L). Ditransfer 5 ml akuades steril ke dalam botol yang bertuliskan H1, 4 ml akuades steril ke dalam H2 dan 10 ml akuades steril ke dalam L. Dibuat suspensi koloni dengan cara mengambil koloni dari kultur LJ kemudian

dimasukkan ke dalam botol yang mengandung *beads* dan tween 80 0,1 %, vorteks 1-2 menit dan didiamkan 15 menit. Setelah itu ditambahkan 1 ml akuades steril, divorteks kembali 1 menit dan didiamkan 15 menit hingga partikel kasar mengendap dan supernatan tampak jernih. Suspensi bakteri sebanyak 1 ml dipindahkan ke dalam botol H1 dan densitasnya disetarakan dengan McFarland 0,5. Satu (1) ml suspensi bakteri dari botol H1 dipindahkan ke dalam botol H2. Seratus (100)  $\mu$ l suspensi bakteri dari botol H2 dipindahkan ke dalam botol L. Lima ratus (500)  $\mu$ l suspensi bakteri dari botol L dipindahkan ke dalam tabung MGIT berlabel kontrol yang telah dipersiapkan. Dipindahkan 500  $\mu$ l dari botol H2 ke dalam tabung MGIT berlabel obat yang telah dipersiapkan. Tabung MGIT kontrol dan yang dengan obat dimasukkan dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam mesin MGIT. Hasil pemeriksaan didapatkan dari mesin setelah inkubasi 4-13 hari.

Jika *Growth Unit* (GU) pada tabung kontrol (tanpa obat) mencapai 400 maka mesin akan memberikan sinyal positif. Pada uji kepekaan OAT lini kedua pembacaan resisten dan sensitive dilakukan secara manual. Jika GU pada tabung yang mengandung obat 100 maka dikatakan resisten.

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji Chi Square untuk melihat hubungan dari kedua uji serta dilihat nilai kesesuaiannya dengan nilai kappa.

## BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN

### 4.1 HASIL

#### 4.1.1 Uji kepekaan OAT lini pertama

*Mycobacterium tuberculosis* membutuhkan waktu pertumbuhan yang lambat dan dibutuhkan waktu 2- 4 minggu untuk dapat melihat koloni bakteri pada permukaan medium padat. Uji kepekaan bakteri terhadap obat antituberkulosis(OAT) dilakukan pada saat bakteri berumur 3-4 minggu. Apabila umur bakteri lebih dari 4 minggu maka harus dilakukan subkultur atau penanaman kembali pada media baru sebelum dilakukan uji kepekaan. Lamanya pertumbuhan *M. tuberculosis* ini mengakibatkan rentang waktu pengujian kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT yang cukup lama. Dibutuhkan waktu 2 bulan sejak inokulasi spesimen pada medium untuk mendapatkan hasil pengujian tersebut.

Selain lamanya masa pertumbuhan bakteri, keberhasilan penelitian ini juga dipengaruhi oleh teknis pengerjaan. Kemungkinan kontaminasi pada kultur menggunakan media MGIT cukup tinggi sehingga diperlukan ketrampilan yang baik dalam pengerjaannya. Untuk memastikan bahwa koloni yang tumbuh adalah mikobakterium dilakukan pewarnaan basil tahan asam (BTA). Pada penelitian ini, dari 40 isolat *M. tuberculosis* 2 isolat merupakan *Mycobacterium non tuberculosis*, sehingga hanya 38 isolat yang digunakan selama uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT.

Tabel 4.1 Hasil Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini pertama menggunakan Lowenstein Jensen(LJ)

LJ	Streptomisin (4 µg/ml)	Isoniazid (0,2 µg/ml)	Rifampisin (40 µg/ml)	Etambutol (2 µg/ml)
Sensitif	24	6	4	23
Resisten	14	32	34	15
Jumlah	38	38	38	38

Pada uji kepekaan *M. tuberculosis* menggunakan media Lowenstein Jensen didapat 14 (36,8 %) isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap streptomisin dan 24 (63,2 %) lainnya sensitif. Isolat yang sensitif terhadap isoniazid sebanyak 6 (15,8 %) dan yang resisten terhadap isoniazid ada 32(84,2 %) isolat. Empat (4) (10,5 %) isolat resisten terhadap rifampisin dan 34(89,5 %) lainnya sensitif. Sedangkan untuk pengujian dengan etambutol didapat 23(60,5 %) isolat yang sensitif dan 15(39,5 %) resisten.

Tabel 4.2 Hasil Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis lini pertama menggunakan BACTEC MGIT 960

MGIT	Streptomisin (1 µg/ml)	Isoniazid (0,1 µg/ml)	Rifampisin (10 µg/ml)	Etambutol (5 µg/ml)
Sensitif	20	5	6	23
Resisten	18	33	32	15
Jumlah	38	38	38	38

Pada penggunaan metode BACTEC MGIT 960 didapatkan 20 (52,6 %) isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap streptomisin dan 18 (47,4 %) lainnya sensitif. Isolat yang sensitif terhadap isoniazid sebanyak 5 (13,2 %) isolat dan yang resisten terhadap isoniazid ada 33 (86,8 %) isolat 6 (15,8 %) isolat resisten terhadap rifampisin dan 32(84,2 %) lainnya sensitif. Sedangkan untuk pengujian dengan etambutol didapat 23 (60,5 %) isolat yang sensitif dan 15 (39,5 %) resisten.

Tabel 4.3 Perbandingan hasil MDR TB menggunakan LJ dan BACTEC MGIT 960

LJ \ MGIT	MDR	Non MDR	Sensitif
MDR <sup>a</sup>	30	0	0
Non MDR <sup>b</sup>	0	4	1
Sensitif <sup>c</sup>	0	1	3

Ket : a. MDR = *Multidrug Resistance*,

b. non MDR = *non Multidrug Resistance* (hanya resisten pada salah satu OAT atau selain Isoniazid dan Rifampisin)

c. isolat sensitif terhadap semua jenis OAT yang diuji

Dari hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini pertama, pada media Lowenstein Jensen (LJ) 30 (78,94 %) isolat merupakan isolat *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR TB), 5 isolat (13,16 %) merupakan isolat yang resisten terhadap isoniazid saja atau rifampisin saja atau OAT lain yang diuji (streptomisin atau etambutol). Terdapat 3 isolat *M. tuberculosis* (7,89 %) yang sensitif terhadap semua jenis OAT yang diuji. Sedangkan pada uji kepekaan menggunakan metode BACTEC MGIT 960, 30 isolat (78,94%) MDR TB, 4 isolat (10,52 %) adalah non MDR-TB dan 4 isolat (10,52) sensitif terhadap semua jenis OAT yang diuji.

#### 4.1.2 Uji Kepekaan OAT lini kedua

Tigapuluh (30) isolat MDR TB yang didapatkan pada tahap awal penelitian ini diuji kepekaannya terhadap OAT lini kedua yaitu ofloksasin, amikasin dan kanamisin. Pemilihan OAT lini kedua ini berdasarkan ketersediaan OAT tersebut di Indonesia pada saat ini serta telah "establish" pada jurnal-jurnal penelitian.

Tabel 4.4 Hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua, n=30

OAT	Lowenstein Jensen	Hasil uji Kepekaan BACTEC MGIT 960	
		Sensitif	Resisten
Ofloksasin	Sensitif	26	0
	Resisten	1	3
Amikasin	Sensitif	21	1
	Resisten	0	8
Kanamisin	Sensitif	26	0
	Resisten	0	4

Tabel 4.5 Sensitifitas dan spesifitas BACTEC MGIT 960 dibandingkan dengan Lowenstein Jensen

OAT lini kedua	% Sensitifitas	% spesifitas
Ofloksasin	75	100
Amikasin	100	95,4
Kanamisin	100	100

#### 4.1.2.1 Ofloksasin

Hasil uji kepekaan menggunakan medium LJ menunjukkan bahwa 26 isolat (86,7 %) *M. tuberculosis* sensitif dan 4 (13,3 %) isolat resisten terhadap ofloksasin. Pada uji kepekaan menggunakan metode BACTEC MGIT 960, didapat bahwa 27 isolat (90 %) sensitif dan 3 (10 %) isolat resisten terhadap ofloksasin.

Penghitungan secara statistik menggunakan Uji Fisher menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap ofloksasin menggunakan medium LJ dan metode BACTEC MGIT 960 ( $p < 0,05$ ) (lampiran 2).

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan ofloksasin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan nilai kappa. Hasil uji kepekaan ofloksasin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 0,835. (lampiran 3)

#### 4.1.2.2 Amikasin

Pada penelitian dengan Lowenstein Jensen 22 isolat (73,3 %) sensitif dan 8 isolat (26,7 %) sensitif terhadap amikasin. Sedangkan pada BACTEC MGIT 960 didapat 21 isolat (70 %) sensitif dan 9 isolat (30 %) resisten terhadap amikasin.

Penghitungan secara statistik menggunakan Uji Fisher menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap amikasin menggunakan medium LJ dan metode BACTEC MGIT 960 ( $p < 0,05$ ). (lampiran 2)

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan amikasin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan

nilai kappa. Hasil uji kepekaan amikasin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 0,916. (lampiran 3)

#### 4.1.2.3 Kanamisin

##### - Penentuan konsentrasi kanamisin

Sedikit sekali informasi yang ada tentang konsentrasi kanamisin untuk uji kepekaan obat menggunakan MGIT 960. Pada penelitian ini dilakukan pengujian menggunakan 2 konsentrasi kanamisin yaitu 1 µg/ml dan 5 µg/ml. Dari pengujian tersebut pada konsentrasi 1 µg/ml didapat 19 isolat resisten dan 11 isolat sensitif. Sedangkan pada konsentrasi 5 µg/ml terdapat 26 isolat sensitif dan 4 isolat resisten.

Menurut protokol Departemen Medical Microbiology, P.D Hinduja Hospital, Mumbai kisaran konsentrasi kanamisin 1- 5 µg/ml. Berdasarkan hasil penelitian, penggunaan konsentrasi 5 µg/ml memberikan hasil dengan tingkat perbedaannya rendah bila dibandingkan dengan uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin menggunakan metode Löwenstein Jensen. Hal ini sesuai dengan penelitian Rusch Gerdes (2006) yang melakukan penelitian uji kepekaan *M. tuberculosis* menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan konsentrasi kanamisin 5 µg/ml.<sup>29</sup>

Pada pengujian dengan Lowenstein Jensen, 26 isolat (86,7 %) sensitif terhadap kanamisin dan 4 isolat (13,3 %) lainnya resisten. Sedangkan pada BACTEC MGIT 960, 26 isolat (86,7 %) sensitif dan 4 isolat (13,3 %) resisten terhadap kanamisin.

Penghitungan secara statistik menggunakan Uji Fisher menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin menggunakan medium LJ dan metode BACTEC MGIT 960 ( $p < 0,05$ ) (lampiran2)

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan kanamisin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan

nilai kappa. Hasil uji kepekaan kanamisin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 1. (lampiran 3)

#### 4.1.2.4 Extensively Drugs Resistance (XDR TB)

Tabel 4.6 Perbandingan hasil uji kepekaan OAT lini kedua

Keterangan	Lowenstein Jensen	BACTECMGIT 960
XDR TB <sup>a</sup>	2	2
Non XDR TB <sup>b</sup>	9	9
Sensitif <sup>c</sup>	19	19

Ket : a. XDR = *Extensively drugs Resistance*,

b. non XDR= *non Extensively drugs Resistance* (hanya resisten pada salah satu OAT )

c. isolat sensitif terhadap semua jenis OAT yang diuji

Dari 30 isolat yang diuji menggunakan OAT lini kedua didapat bahwa 2 isolat merupakan *Extensively Drugs Resistance* (XDR TB), 9 isolat resisten hanya pada salah satu OAT lini kedua, dan 19 isolat sensitif terhadap OAT lini kedua.

#### 4.1.3 Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri dengan pertumbuhan yang lambat. Uji kepekaan menggunakan media Lowenstein Jensen membutuhkan waktu 18 sampai 21 hari sejak didapatkan koloni murni dari hasil biakan spesimen. Sedangkan uji sensitifitas menggunakan metode BACTEC MGIT 960 membutuhkan waktu lebih singkat yaitu 5 sampai 12 hari.

Tabel 4.7 Waktu pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

Metode	Rata-rata hasil uji kepekaan
Media LJ	18-28 hari (rata-rata 21 hari)
BACTEC MGIT 960	5-12 hari (rata-rata 9 hari)

## 4.2 PEMBAHASAN

Lowenstein Jensen (LJ) merupakan media yang paling umum dan direkomendasi oleh WHO untuk digunakan sebagai media pertumbuhan *Mycobacterium sp.* terutama *M. tuberculosis*. LJ adalah media selektif yang mengandung zat warna hijau malakhit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain dan jamur. Meskipun LJ umum digunakan untuk pertumbuhan mikobakterium dan uji kepekaan bakteri terhadap obat tetapi penghitungan koloni sulit dilakukan pada permukaan media yang sempit.

Pada penelitian ini digunakan 40 isolat MDR TB koleksi Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUI. Empat puluh (40) isolat tersebut disubkultur menggunakan media Lowenstein Jensen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 minggu. Setiap minggu sekali dilakukan pengecekan untuk menyingkirkan kemungkinan pertumbuhan bakteri yang cepat tumbuh seperti *M. fortuitum*. Setelah terlihat adanya koloni pada media dilakukan identifikasi menggunakan pewarnaan basil tahan asam (BTA) Ziehl Neelsen. Selain itu dilakukan konfirmasi spesies menggunakan medium yang mengandung PNB (Paranitro-Benzoic Acid). Apabila isolat tumbuh pada medium dengan PNB maka dipastikan koloni yang tumbuh adalah mikobakterium non tuberkulosis. Pada penelitian ini konfirmasi juga dilakukan dengan uji niasin. Apabila pada uji niasin terjadi perubahan warna pada strip menjadi kuning maka dipastikan koloni tersebut adalah *M. tuberculosis*. Dari 40 isolat MDR TB yang ditumbuhkan kembali dari medium stok, 2 isolat tumbuh pada media PNB sehingga terdapat 38 isolat *M. tuberculosis* yang diuji kepekaannya terhadap obat streptomisin, isoniazid, rifampisin dan etambutol sebagai obat anti tuberkulosis lini pertama. Apabila uji menunjukkan bahwa isolat bukan MDR TB maka tidak dilakukan uji kepekaan terhadap OAT lini kedua.

### 4.2.1 Uji Kepekaan obat antituberkulosis lini pertama

Pada penelitian ini, uji kepekaan menggunakan LJ dan BACTEC MGIT 960 didapat sebanyak 30 isolat (78,94 %) merupakan MDR TB. (tabel 4.3)

Resistensi bakteri tuberkulosis terhadap OAT mulai menjadi masalah seiring digunakannya rifampisin secara luas semenjak tahun 1970-an. Faktor utama terjadinya resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT adalah penatalaksanaan pasien TB yang tidak kuat.

Resistensi obat berhubungan dengan riwayat pengobatan sebelumnya. Kemungkinan terjadinya resistensi pada pasien dengan riwayat pengobatan sebelumnya adalah 4 kali lipat, sedangkan untuk terjadinya MDR TB sebesar 10 kali lipat dibandingkan dengan pasien yang belum pernah diobati.

#### 4.2.2 Obat anti tuberkulosis lini kedua

MDR TB yang didefinisikan sebagai isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin merupakan masalah penting dalam kesehatan masyarakat di beberapa negara berkembang. Laboratorium TB pada negara dengan endemik TB sangat dibutuhkan untuk melakukan uji kepekaan obat tidak hanya untuk uji OAT lini pertama tetapi juga untuk uji OAT lini kedua.

Hingga saat ini belum ada metode uji kepekaan OAT lini kedua yang ditetapkan sebagai metode baku. Sementara itu berdasarkan laporan WHO, peningkatan resistensi bakteri terhadap obat membutuhkan perhatian lebih karena beberapa negara telah melaporkan tingginya resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua.<sup>29</sup>

Sangat penting bagi usaha pemberantasan dan pencegahan penyakit tuberkulosis untuk menemukan metode yang cepat, tepat dan ekonomis untuk mengetahui kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* tidak hanya terhadap OAT lini pertama tetapi juga lini kedua. Kultur tuberkulosis dan uji kepekaan merupakan hal yang paling penting dalam pengendalian penyakit tuberkulosis.

##### 4.2.2.1 Ofloksasin

Pada uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap ofloksasin menggunakan medium LJ didapatkan bahwa 26 isolat (86,6 %) sensitif dan 4 (13,33 %) isolat resisten.(tabel 4.6)

Sedangkan pada uji menggunakan metode BACTEC MGIT 960 didapatkan 27 isolat (90 %) sensitif terhadap ofloksasin dan 3 isolat (10%) resisten. Penelitian Martin (2008) tentang uji kepekaan *M. tuberculosis* menggunakan MGIT manual di Brasil pada 188 isolat menunjukkan hasil 147 isolat (78 %) sensitif dan 41 isolat (21 %) resisten terhadap ofloksasin.<sup>9</sup> Dan penelitian juga dilakukan oleh Rinaldi menggunakan metode *Drug Susceptibility Culture Plate* (DSCP) pada 41 isolat MDR TB didapatkan resistensi terhadap ofloksasin yaitu 7,3 %.<sup>21</sup>

Isolat yang resisten ofloksasin merupakan isolat yang juga resisten terhadap semua OAT lini pertama yang diuji (streptomisin, isoniazid, rifampisin, dan etambutol). Satu isolat yang resisten terhadap ofloksasin pada uji dengan Löwenstein Jensen dan sensitif pada BACTEC MGIT 960, saat uji OAT lini pertama memberikan hasil yang berbeda antara uji pada Löwenstein Jensen dengan BACTEC MGIT 960. Pada Löwenstein Jensen isolat tersebut resisten terhadap streptomisin, isoniazid, rifampisin, dan etambutol sedangkan pada BACTEC MGIT 960 resisten terhadap streptomisin, isoniazid, dan rifampisin dan sensitif terhadap etambutol.

Fluorokuinolon merupakan OAT lini kedua yang paling potensial untuk pengobatan TB. *Critical concentration* untuk ofloksasin adalah 2 µg/ml.<sup>9</sup> Ofloksasin bekerja dengan menghambat DNA gyrase yaitu enzim yang membantu pemisahan replikasi DNA sehingga pembelahan sel *M. tuberculosis* terhambat. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap ofloksasin terjadi karena mutasi pada subunit A (gen *gyr A*) pada DNA gyrase.<sup>28</sup>

#### 4.2.2.2 Amikasin

Amikasin merupakan obat suntik yang golongan aminoglikosida yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom 30S. Dari hasil uji kepekaan pada 30 isolat didapat bahwa 9 isolat resisten (30 %) terhadap amikasin. Aminoglikosida hanya bekerja pada bakteri yang sedang membelah, oleh karena itu antibiotik ini hanya berguna pada pengobatan fase induksi. Amikasin umumnya aktif terhadap mikobakterium yang sudah resisten terhadap streptomisin.<sup>15</sup>

Pada penelitian ini didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifisitas 95,4 %. (tabel 4.5) Penelitian yang dilakukan Kruuner (2005) pada 133 isolat yang dilakukan uji kepekaan amikasin dengan konsentrasi 1 µg/ml menggunakan MGIT 960 menunjukkan hasil 108 isolat (81,20 %) sensitif dan nilai sensitifitas uji adalah 96 % serta spesifisitasnya 99 %.<sup>30</sup> Sensitifitas dan spesifisitas MGIT 960 yang tinggi memperlihatkan bahwa MGIT baik untuk uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap amikasin.

Empat isolat yang resisten terhadap amikasin merupakan isolat yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin sedangkan 4 isolat lain merupakan isolat yang resisten terhadap semua OAT lini pertama yang diuji.

#### 4.2.2.3 Kanamisin

Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin menggunakan MGIT 960 didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifisitas 100 %. Penelitian Bastian (2001) tentang uji kepekaan kanamisin pada MGIT dengan konsentrasi kanamisin 5 µg/ml didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifisitas 97 % dengan waktu rata-rata hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin adalah 5,1 hari.<sup>31</sup>

Kanamisin merupakan OAT yang berperan dalam menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom 30S. Keempat isolat yang resisten terhadap kanamisin merupakan isolat yang juga resisten terhadap semua OAT lini pertama yang digunakan.

#### 4.2.2.4 XDR TB

Pada penelitian ini terdapat 2 isolat yang merupakan XDR TB. (tabel 4.6) Pada uji kepekaan Oat lini pertama kedua isolat tersebut merupakan isolat yang resisten terhadap semua OAT lini pertama (streptomisin, isoniazid, rifampisin, dan etambutol).

Faktor penyebab XDR TB adalah karena penatalaksanaan pengobatan pasien TB yang tidak dilaksanakan dengan baik. Faktor-faktor tersebut antara lain berasal dari petugas kesehatan (pengobatan tidak

menggunakan panduan yang tepat, dosis, jenis dan jumlah obat yang tidak adekuat), dari pasien (ketidaksiplinan pasien dalam meminum obat), dan dari program penanggulangan TB (persediaan OAT yang kurang dan kualitasnya yang rendah).

XDR TB dapat dicegah melalui penanganan MDR TB tegan tepat untuk meningkatkan kesembuhan MDR TB dan mencegah penyebaran reistensi TB serta penanganan pasien TB non MDR dengan sebaik-baiknya.

#### 4.2.3 Waktu pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

Uji kepekaan terhadap obat antituberkulosis konvensional membutuhkan waktu 3 sampai 8 minggu untuk mengidentifikasi strain sensitif atau resisten terhadap OAT.

Medium cair seperti *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) membutuhkan waktu inkubasi kurang lebih 15 hari untuk menumbuhkan *M.tuberculosis*, 1-2 minggu lebih cepat bila dibandingkan pertumbuhannya pada media padat. Pada penelitian ini, uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua pada medium LJ membutuhkan waktu 18-28 hari sedangkan metode BACTEC MGIT 960 akan memberikan sinyal positif pada hari 5-12 (rata-rata 9 hari).(tabel 4.7) Hal ini sesuai dengan Martin (2008) yang mengemukakan bahwa penggunaan media padat dibutuhkan 3 sampai 8 minggu untuk mengetahui strain yang sensitif atau resisten terhadap OAT, sedangkan media cair dapat membantu mempersingkat lamanya pemeriksaan, yaitu 15 hari.

Rishi (2007) juga mengemukakan bahwa pertumbuhan *M.tuberculosis* pada MGIT 960 lebih cepat dibandingkan pada media LJ. Pada MGIT 960 rata-rata pertumbuhannya adalah 9,66 hari (2-39) sedangkan pada media LJ 28,81 hari ( 7-48 hari).<sup>8</sup>

Pada Juni 2007 WHO merekomendasikan penggunaan media cair untuk kultur dan uji kepekaan pada negara sedang berkembang untuk menghadapi epidemi HIV-TB dan resistensi obat TB.<sup>9</sup>

Telah dilaporkan bahwa MGIT merupakan metode yang sensitif dan cepat untuk uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini pertama tetapi belum ada metode uji standar untuk OAT lini kedua.

Diagnosis laboratorium MDR-TB dan XDR TB (*extensively drug resistant TB*) menggunakan BACTEC MGIT 960 untuk obat lini kedua yang diaplikasikan langsung pada sampel sputum dapat menghemat waktu pemeriksaan. Pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa penggunaan BACTEC MGIT 960 untuk uji kepekaan OAT lini kedua tidak memberikan hasil yang berbeda dengan uji kepekaan menggunakan media Lowenstein Jensen (metode proporsi).

Tidak tersedianya kit komersial OAT lini kedua sepertinya OAT lini pertama yang dikenal sebagai kit SIRE menyebabkan pembuatan larutan kerja obat harus dipersiapkan secara akurat. Kualitas kontrol menggunakan strain H<sub>37</sub>Rv sebagai kontrol sensitif dan strain yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis lini kedua harus selalu dilakukan untuk meningkatkan keakuratan hasil uji. Selain itu pembacaan hasil resisten atau sensitif tidak secara otomatis dibaca oleh alat seperti halnya pada lini pertama. Hasil harus dianalisis secara manual dengan melihat nilai *Growth Unit* (GU) yang dikeluarkan oleh alat. Jika nilai GU 100 pada tabung yang mengandung obat maka dikatakan isolat tersebut resisten.

Penggunaan BACTEC MGIT 960 untuk uji kepekaan obat anti tuberkulosis mempunyai kelebihan yaitu hasil yang lebih cepat sehingga diharapkan dapat membantu klinisi dalam menentukan terapi bagi penderita tuberkulosis dengan cepat dan tepat. Selain itu, kekurangan dari BACTEC MGIT 960 adalah tingkat kontaminasi pengujian yang tinggi. Apabila mesin MGIT 960 memberikan sinyal positif, kultur tersebut harus diperiksa kembali menggunakan pewarnaan BTA untuk konfirmasi keberadaan bakteri *Mycobacterium* yang tahan asam atau bakteri lain seperti streptococcus. Selain itu dibutuhkan juga keahlian untuk melakukan uji kepekaan dan harganya yang lebih mahal daripada metode konvensional. Sedangkan LJ sendiri

mempunyai kelebihan yaitu mudah, murah dan dapat dilakukan pada laboratorium dengan peralatan terbatas.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Pada uji kepekaan ofloksasin pada media Löwenstein Jensen didapat 26 isolat sensitif terhadap ofloksasin, 12 isolat sensitif terhadap amikasin dan 26 isolat sensitif terhadap kanamisin.
2. Pada uji kepekaan dengan BACTEC MGIT 960 terdapat 27 yang sensitif terhadap ofloksasin, 22 isolat sensitif terhadap amikasin dan 26 isolat sensitif terhadap kanamisin.
3. Terdapat isolat yang resisten terhadap semua obat antituberkulosis lini kedua yang digunakan dalam penelitian.
4. Terdapat hubungan bermakna antara hasil uji kepekaan *M.tuberculosis* terhadap OAT lini kedua menggunakan medium LJ dan metode BACTEC MGIT 960.
5. Uji kepekaan OAT lini kedua dengan BACTEC MGIT 960 lebih cepat didapatkan hasil daripada menggunakan media Lowenstein Jensen.

#### 5.2 SARAN

Saran yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Pelatihan uji kepekaan dengan BACTEC MGIT 960 sebaiknya sering dilakukan untuk mendapatkan tenaga yang terampil dalam melakukan metode ini.
2. Perlu dilakukan uji molekuler pada isolat yang memberikan hasil yang berbeda pada LJ dan BACTEC MGIT 960 yaitu pada gen penyebab resistensi ofloksasin (*gyr A*) dan amikasin/kanamisin (gen *rpsL* dan gen *rrs*).

## DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. *Tuberculosis*. Diunduh dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>. Diakses tanggal 3 Mei 2009
2. *Lembar Fakta TB*. Diunduh dari [www.tbindonesia.or.id/pdf/Lembar\\_Fakta\\_TB.pdf](http://www.tbindonesia.or.id/pdf/Lembar_Fakta_TB.pdf). Diakses tanggal 3 Mei 2009.
3. TB factsheet Indonesia. Diunduh dari [www.tbindonesia.or.id/pdf/TB factsheet Indonesia](http://www.tbindonesia.or.id/pdf/TB_factsheet_Indonesia.pdf). Diakses tanggal 3 Mei 2009.
4. Jawetz, Melnick dan Adelberg's. 2004 *Medical microbiology*, ed.23. California: Appleton and Lange. Hal. 319, 321-324.
5. CDC. Emergence of Mycobacterium tuberculosis with Extensive Resistance to Second-Line Drugs-Worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55 (11): 301-5
6. WHO. XDR- TB, Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Diunduh dari [http://www.who.int/xdrmap\\_20june\\_en.pdf](http://www.who.int/xdrmap_20june_en.pdf). Diakses tanggal 23 Juli 2007
7. Ardito, F, B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti and G. Fadda. 2001. *Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39(12):4440-44
8. Rishi, S, P Sinha, B Malhotra, N Pal. 2007. *A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination*. *Indian J. Med. Microbiol.* 25(4): 383-6
9. Martin, A, A. von Groll, K. Fissette, J.C Palomino, F. Varaine, and F. Portaels. 2008. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis Resistance to Second-Line Drugs by Use of the Manual Mycobacterium Growth Indicator Tube System*. *J. Clin. Microbiol.* 46(12); 3952-3956.
10. Bauman, Robert. W. *Microbiology*. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004. Hal. 328-329
11. Mc Donough, K, A, Y. Kress, B.R Bloch. 1993. *Pathogenesis of Tuberculosis: Interaction of Mycobacterium tuberculosis with Macrophages*. *J. Infection & Immunity*, July 1993, p 2763-2773
12. Perri, G.D, S. Bonora. 2004. *Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis?* *J. Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 54, 593-602

13. Clinical Microbiology Reviews, July 2003, p. 463-496
14. Armen Muchtar. *Farmakologi Obat Antituberkulosis (OAT) Sekunder*. J. Tuberkulosis Indonesia 3(8), 23-28.
15. Hillemann, D, M.Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, and S. Niemann. *Use of Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates*. J. Clin. Microbiol. Aug. 2005, p. 3699-3703
16. Raviglione, M.C, I.M. Smith. 2007. *XDR Tuberculosis-Implication for Global Health*. The New England Journal Medicine. Vol:356;656-659.
17. WHO. 2008. *Drugs Susceptibility Reports*. Diunduh dari [www.who.int/tb/publications/2008/drs\\_report4\\_26feb08.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf)
18. Gandhi NR, Moll A, Sturn AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G. 2006. *Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients infected with tuberculosis and HIV in rural South Africa*. Lancet 2006 Nov 4; 368: 1575-80
19. Ronald M. Atlas, James W. Snyder. 2006. *Handbook of media for clinical microbiology*. Edition: 2.CRC Press,. Hal 290-291
20. Sjahrurachman, Agus. 2008. *Kultur dan uji kepekaan M. tuberculosis terhadap obat anti tuberculosis lini pertama*. Departemen Kesehatan RI.
21. Rinaldi. 2007. *Uji Kepekaan Obat Tuberkulosis Lini Kedua Terhadap Isolat penderita Tuberkulosis dengan REsisten Ganda Obat Menggunakan Drug Susceptibility Culture Plate*. Tesis. Program Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik FKUI.
22. Balabanova, Y, et.al. 2005. *Multidrug-resistant tuberculosis in Russia: Clinical characteristics, analysis of second-line drug resistance and development of standardized therapy*. Eur.J.Clin. Microbiol. Infec. Dis. 24(2): 136-139
23. SOP BACTEC MGIT 960 SIRE Kit, Uji Kepekaan Obat Anti Tuberkulosis. Lab. Mikrobiologi Klinik FKUI
24. WHO. *Policy Guidance on Drug Susceptibility Testing (DST) of Second-line Anti-Tuberculosis Drugs*, Final Draft. Geneva, October 2007.

25. Protokol pemeriksaan uji resistensi berdasarkan Guidelines for drugs susceptibility Testing For Second-Line anti Tuberculosis for Dots-Plus tahun 2001
26. Barclay, L. 2007. *Drug Resistant Tuberculosis increasing from Use of Second Line Drugs*. *MMWR*. 2007;56(11):245-250, 250-253
27. Ichimura, S, et all. 2007. *Evaluation of the Invader Assay with BACTEC MGIT 960 System for Prompt Isolation and Identification of Mycobacterial Species from Clinical Specimens*. *J. Clin. Microbiol.* 45(10): 3316-3322.
28. Ballell, L, et all. 2005. Minireview: *New Small-Molecule Synthetic Antimicrobials*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6): 2153-2163.
29. Rusch-Gerdes, S, G.E Pfyffer, M. Casal, M. Chadwick, and S. Sidiqi. 2006. *Multicenter Laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for Testing Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to Classical Second-Line drugs and Newer Antimicrobials*. *J. Clin. Microbiol* 44(3): 688-692.
30. Kruuner, A., M.D. Yates, F. Drobniowski. 2006. *Evaluation of MGIT 960-based Antimicrobial Testing of Critical Concetration of first and Second-Line Antimicrobial Drugs with Drug Resistant Clinical Strain of M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol* 44(3): 811-818
31. Bastian, I., L. Rigouts, J. C. Palomino, and F. Portaels. 2001. *Kanamycin susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using Mycobacterium Growth Indicator Tube and a colorimetric method*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1934-1936.



## RIWAYAT HIDUP

1. Nama : Yuni Rukminiati
2. NPM : 0606 000 270
3. Alamat : Jl. RA Kartini RT 008/03 no 26 Bekasi
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Magetan, 11 Juni 1980
6. Riwayat Pendidikan :

SD	: SDN Margahayu Selatan Bekasi	Lulus Tahun 1992
SMP	: SMPN 1 Bekasi	Lulus Tahun 1995
SMA	: SMUN 1 Bekasi	Lulus Tahun 1998
S1	: Universitas Padjadjaran	Lulus Tahun 2004

Jurusan Biologi Fakultas MIPA
7. Riwayat Pekerjaan :

- Editor PT Bumi Aksara	2005-2006
- Produk Spesialis PT Nutrilab Pratama	Juli- Desember 2008

Sumber dana penelitian : Departemen Mikrobiologi FKUI

## Lampiran I

## Penghitungan larutan kerja obat anti tuberkulosis lini kedua MGIT 960

## 1. Ofloksasin (2 µg/ml)

Konsentrasi stok =10.0 mg/ml (10,000 µg/ml)

Konsentrasi akhir = 2.0 µg/ml

Obat per tabung MGIT 960 =16,6 µg

Untuk membuat larutan kerja :

$$10,000 \div 166 = 60,24$$

Satu bagian obat dalam 59,24 air (100µl obat dalam 5.924 ml akuades steril)

## 2. Amikasin(1 µg/ml)

Konsentrasi stok =10.0 mg/ml (10,000 µg/ml)

Konsentrasi akhir =1.0 µg/ml

Obat per tabung MGIT 960 =8,3 µg

Untuk membuat larutan kerja :

$$10,000 \div 83 = 120.48$$

Satu bagian obat dalam 119,48 air (100µl obat dalam 11.95ml akuades steril)

## 3. Kanamisin (5 µg/ml)

Konsentrasi stok =10.0 mg/ml (10,000 µg/ml)

Konsentrasi akhir =5.0 µg/ml

Obat per tabung MGIT 960 =41,5 µg

Untuk membuat larutan kerja :

$$10,000 \div 415 = 24,09$$

Satu bagian obat dalam 23,09 air (100µl obat dalam 2,309 ml akuades steril)

## Lampiran 2

## Hasil Uji Statistik

**Chi-Square Tests ofloxasin**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	21.667(b)	1	.000		
Continuity Correction(a)	14.135	1	.000		
Likelihood Ratio	15.006	1	.000		
Fisher's Exact Test				.001	.001
Linear-by-Linear Association	20.944	1	.000		
N of Valid Cases	30				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .40.

**Chi-Square Tests amikasin**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	25.455(b)	1	.000		
Continuity Correction(a)	21.112	1	.000		
Likelihood Ratio	28.516	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	24.606	1	.000		
N of Valid Cases	30				

a Computed only for a 2x2 table

b 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.40.

**Chi-Square Tests kanamisin**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	21.667(b)	1	.000		
Continuity Correction(a)	14.135	1	.000		
Likelihood Ratio	15.006	1	.000		
Fisher's Exact Test				.001	.001
Linear-by-Linear Association	20.944	1	.000		
N of Valid Cases	30				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .40.

## Lampiran 3

## Nilai Kappa:

## 1. Ofloksasin

MGIT 960 \ LJ	Sensitif	Resisten	
Sensitif	26	0	26
Resisten	1	3	4
	27	3	30

Kesesuaian nyata  $= (26+3)/30 = 96,6 \%$

Kesesuaian karena peluang  $= (26 \times 27)/30 + (4 \times 3)/30 : 30 = 79,3 \%$

Kesesuaian bukan akibat peluang  $= (96,6 - 79,3)\% = 17,3 \%$

Potensi kesesuaian bukan peluang  $= (100 - 79,3)\% = 20,7\%$

*Kappa*  $= 17,3\%/20,7\% = 0,835 = 83,5 \%$

## 2. Amikasin

MGIT 960 \ LJ	Sensitif	Resisten	
Sensitif	21	1	22
Resisten	0	8	8
	21	9	30

Kesesuaian nyata  $= (21+8)/30 = 96,6 \%$

Kesesuaian karena peluang  $= (21 \times 22)/30 + (8 \times 9)/30 : 30 = 59,3 \%$

Kesesuaian bukan akibat peluang  $= (96,6 - 59,3)\% = 37,3 \%$

Potensi kesesuaian bukan peluang  $= (100 - 59,3)\% = 40,7\%$

*Kappa*  $= 37,3\%/40,7\% = 0,916 = 91,6 \%$

## 3. Kanamisin

MGIT 960 \ LJ	Sensitif	Resisten	
Sensitif	26	0	26
Resisten	0	4	4
	26	4	30

Kesesuaian nyata  $= (26+4)/30 = 100 \%$

Kesesuaian karena peluang  $= (26 \times 26)/30 + (4 \times 4)/30 : 30 = 76,8 \%$

Kesesuaian bukan akibat peluang  $= (100 - 76,8)\% = 23,2 \%$

Potensi kesesuaian bukan peluang  $= (100 - 76,8)\% = 23,2\%$

*Kappa*  $= 23,2\%/23,2\% = 1 = 100 \%$

Hasil Uji kepekaan OAT lini pertama

	isolat	kontrol	LOWENSTEIN JENSEN					BACTEC MGIT 960						
			S	I	R	E	S	I	R	E	S	I	R	E
1	72120	400	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
2	71478	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
3	71843	400	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
4	71914	400	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	71916	400	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
6	71928	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	72121	400	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R
8	80004	400	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S
9	80013	400	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
10	80067	400	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
11	80081	400	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	80115	400	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
13	80143	400	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
14	80151	400	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
15	80157	400	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
16	80590	400	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
17	80593	400	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
18	80598	400	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
19	80702	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
20	80766	400	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
21	80776	400	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	80777	400	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
23	80779	400	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
24	80813	400	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
25	80968	400	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
26	Myc 117/04	400	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
27	Myc 035/04	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
28	Myc 045/05	400	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
29	Myc 002/05	400	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
30	Myc 017/05	400	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
31	Myc 140/04	400	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S

32	Myc 036/04	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
33	Myc 034/04	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
34	Myc 018/05	400	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
35	4478	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
36	2982	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
37	80030	400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	80017	400	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R



Hasil Uji kepekaan OAT lini kedua

Nomor	isolat	kontrol	LOWENSTEIN JENSEN						BACTEC MGIT 960			
			ofloksasin	amikasin	kanamisin	kanamisin	ofloksasin	amikasin	kanamisin	kanamisin	Waktu (hari:jam)	
1	71478	400	S	S	R	R	S	S	R	R	11;7	
2	71843	400	S	S	S	S	S	S	S	S	8;9	
3	71916	400	S	S	S	S	S	R	S	S	7;19	
4	71928	400	S	S	S	S	S	S	S	S	4;15	
5	80004	400	S	R	S	S	S	R	S	S	5;22	
6	80067	400	S	S	S	S	S	S	S	S	9;23	
7	80115	400	S	S	S	S	S	S	S	S	6;19	
8	80143	400	R	R	R	R	R	R	R	R	9;0	
9	80151	400	S	S	S	S	S	S	S	S	9;20	
10	80157	400	S	R	S	S	S	R	S	S	8;15	
11	80590	400	S	S	S	S	S	S	S	S	11;16	
12	80598	400	S	S	S	S	S	S	S	S	7;14	
13	80702	400	S	S	S	S	S	S	S	S	9;23	
14	80766	400	S	S	S	S	S	S	S	S	8;8	
15	80779	400	S	S	S	S	S	S	S	S	7;3	
16	80813	400	S	S	S	S	S	S	S	S	11;14	
17	80968	400	S	S	S	S	S	S	S	S	12;12	
18	Myc 018/05	400	S	S	S	S	S	S	S	S	10;17	
19	Myc 034/04	400	R	R	R	R	R	R	R	R	8;16	
20	Myc 035/04	400	S	R	R	R	S	R	R	R	8;0	
21	Myc 036/04	400	R	S	S	S	S	S	S	S	10;7	
22	Myc 045/05	400	S	S	S	S	S	S	S	S	7;0	
23	Myc 117/04	400	S	S	S	S	S	S	S	S	10;1	
24	Myc 140/04	400	S	R	R	R	S	R	R	R	9;16	
25	Myc 017/05	400	S	R	R	R	S	R	R	R	7;3	
26	Myc 064/04	400	S	S	S	S	S	S	S	S	7;22	
27	80030	400	S	R	R	R	S	R	R	R	7;22	
28	4478	400	R	R	R	R	R	R	R	R	12;20	
29	2982	400	S	S	S	S	S	S	S	S	8;22	
30	80017	400	S	S	S	S	S	S	S	S	10;2	

**UJI KEPEKAAN OBAT ANTI TUBERKULOSIS LINI KEDUA MENGGUNAKAN MEDIA LOWENSTEIN JENSEN DAN MYCOBACTERIUM GROWTH INDICATOR TUBES (MGIT) 960**

Yuni Rukminiati, Anis Karuniawati, Retno Kadarsih  
Departemen Mikrobiologi FKUI

Penyebaran *Multidrug Resisten Tuberculosis* (MDR TB) yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan perhatian untuk program penanganan TB. Obat antituberkulosis lini kedua digunakan untuk pengobatan penderita MDR TB. Kami melakukan penelitian tentang Uji kepekaan obat antituberkulosis lini kedua menggunakan media Lowenstein Jensen dibandingkan dengan *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT 960) sistem. Tiga puluh (30) isolat bakteri MDR TB di uji dengan ofloksasin, amikasin, dan kanamisin menggunakan BACTEC MGIT 960 dan hasilnya dibandingkan dengan metode proporsi pada media Lowenstein Jensen. Dari hasil penelitian pada BACTEC MGIT 960 didapat 27 isolat (90 %) sensitif terhadap ofloksasin, 21 isolat (70 %) sensitif terhadap amikasin dan 26 isolat (86,6 %) sensitif terhadap kanamisin. Dua isolat merupakan *Extensively Drugs Resistance* (XDR TB). Waktu untuk uji kepekaan dengan MGIT adalah 9 hari sedangkan dengan metode proporsi 21 hari.

Kata Kunci :

Tuberkulosis, MDR-TB, obat antituberkulosis lini kedua

***Susceptibility testing of Mycobacterium Tuberculosis to second line drugs by use of Lowenstein Jensen Media and Mycobacterium Growth Indicator Tube System (MGIT) 960***

*The emergence of Multidrug resistant tuberculosis (MDR TB) caused by Mycobacterium tuberculosis is real threat for TB control program. Second line drugs was using for Person who has MDR TB. The objective of this study was to evaluate the Lowenstein Jensen Medium for testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to second line drugs compared to the BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT 960 )System. Thirty MDR TB isolates were tested for susceptibility to ofloxacin, amikacin, and kanamycin by MGIT 960, and the result were compared to those obtain with proportion method on Lowenstein Jensen media, considered a reference method. Result for ofloxacin were 27 isolate(90%) sensitive,21 isolate (70%) sensitive to amikacin and 26 isolate(86,6 %) sensitive to kanamycin .The time required to obtain result was an average of 9 days by the BACTEC MGIT 960 and 21 days by the reference method.*

Keyword :

*Tuberculosis, Mutidrugs resistant Tuberculosis (MDR TB), second line drugs*

Tuberkulosis merupakan penyakit berbahaya ke-3 setelah penyakit jantung dan pernafasan akut yang menyebabkan kematian di dunia.<sup>1</sup>

Setiap tahunnya di Indonesia bertambah 250 ribu kasus baru tuberkulosis dan terjadi sekitar 140.000 kematian terjadi setiap tahunnya. Sebagian besar penderita tuberkulosis adalah usia produktif (15-55 tahun).<sup>2</sup>

Penderita tuberkulosis dapat disembuhkan dengan minum obat anti tuberkulosis secara lengkap dan teratur. Obat anti tuberkulosis (OAT) seperti isoniazid, rifampisin, etambutol dan pirasinamid merupakan obat lini pertama yang relatif efektif dan murah. Jika penderita tuberkulosis tidak melakukan pengobatan secara teratur dan disiplin, mendapat obat yang tidak adekuat (baik dosis, kombinasi obat maupun lamanya pengobatan) maka dapat mengakibatkan terjadinya resistensi obat.<sup>3</sup>

Pada tahun 1990-an telah dilaporkan adanya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap dua obat penting dalam pengobatan tuberkulosis yaitu isoniazid dan rifampisin yang disebut *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB).

Laboratorium berperan penting dalam mengidentifikasi kasus MDR TB. Kecepatan dan keakuratan hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis lini kedua akan membantu klinisi membuat keputusan dalam pemilihan terapi obat dan membantu untuk mencegah penyebaran MDR TB.

Metode proporsi menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ) merupakan metode baku emas yang membutuhkan waktu inkubasi yang lama (umumnya 21 hari semenjak kultur positif).<sup>4</sup>

BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) 960 merupakan sistem yang otomatis dengan kapasitas besar, dan tidak mengandung radioaktif.

Sistem BACTEC MGIT 960 menggunakan tabung kultur yang berisi media middlebrook 7H9 modifikasi dengan fluoresen yang tertanam pada bagian dasar tabung. Kultur *M. tuberculosis* menggunakan media cair seperti BACTEC MGIT 960 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih cepat dibandingkan dengan media padat. Pada media cair hanya dibutuhkan sekitar 15 hari setelah kultur positif untuk mendapatkan hasil uji kepekaan obat.

Pada penelitian ini akan dibandingkan uji kepekaan OAT lini kedua (menggunakan ofloksasin, amikasin, dan kanamisin) menggunakan media Lowenstein Jensen dan BACTEC MGIT 960.

#### **BAHAN dan CARA KERJA**

**Bahan.** Penelitian menggunakan 40 isolat *M. tuberculosis* yang berasal dari isolat stok Departemen Mikrobiologi FKUI dari tahun 2005-2008. 30 isolat merupakan MDR TB. Strain H37Rv digunakan sebagai isolat kontrol sensitif dan isolat kontrol resisten terhadap amikasin/kanamisin serta isolat kontrol resisten ofloksasin berasal dari *WHO Supranational Reference Lab. Network* (IMVS Australia). Semua isolat di subkultur pada media Lowenstein Jensen sebelum diuji dengan obat antituberkulosis.

**Obat Antituberkulosis.** Semua obat antituberkulosis yang digunakan berbentuk bubuk. Streptomisin, Isoniazid, Rifampisin dan Etambutol (SIRE) untuk media Lowenstein Jensen serta ofloksasin, amikasin, dan kanamisin berasal dari SIGMA. Sedangkan SIRE untuk MGIT 960 sudah berupa kit dari Bactec Dickinson (BD). Semua OAT dilarutkan dengan akuades steril kecuali Streptomisin dengan dimetilformamide dan ofloksasin dengan 0,1 N NaOH. Semua OAT disimpan di  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Uji Kepekaan OAT OAT lini pertama.** Uji kepekaan OAT dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan WHO

dengan *critical concentration* pada LJ: streptomisin 4 µg/ml, isoniazid 0,2 µg/ml, rifampisin 40 µg/ml, dan etambutol 4 µg/ml. Hasil dibaca pada hari ke 28 dan 40 setelah inkubasi pada suhu 37°C. Sedangkan *critical concentration* untuk BACTEC MGIT 960 yaitu streptomisin 1 µg/ml, isoniazid 0,1 µg/ml, rifampisin 1 µg/ml, dan etambutol 5 µg/ml.<sup>5,6,9</sup>

**Uji kepekaan OAT lini Kedua.** Protokol uji kepekaan lini kedua sama dengan protokol untuk obat lini pertama. *Critical Concentration* pada media LJ dari ofloksasin adalah 2 µg/ml, amikasin 40 µg/ml, dan kanamisin 30 µg/ml. *Critical Concentration* pada BACTEC MGIT 960 dari ofloksasin adalah 2 µg/ml, amikasin 1 µg/ml, dan kanamisin 5 µg/ml.<sup>8</sup>

**MGIT.** Suspensi bakteri untuk inokulasi adalah 0,5 McFarland (H1). Dari tabung suspensi tersebut dipindahkan 1 ml ke tabung yang mengandung akuades 4ml (H2). Dari tabung H1 dipindahkan 100 µl ke dalam tabung yang mengandung 10 ml akuades (L). Setiap tabung bbl 7 ml MGIT ditambahkan 0,8 ml oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC). OAT ditambahkan ke dalam tabung kultur sebanyak 100 µl. Tabung kontrol tidak menggunakan antibiotik. Pada tabung diinokulasi 0,5 ml suspensi bakteri dari tabung H2 ke tabung yang mengandung obat dan diinokulasikan 0,5 ml dari tabung L ke tabung kontrol, kemudian dinkubasi pada sistem MGIT 960. Sinyal positif akan keluar pada hari ke 5 sampai 12.<sup>7</sup>

**Analisis Data.** Data dianalisis menggunakan uji Chi Square dan kesesuaiannya dilihat dengan nilai kapa.

## HASIL

40 isolat *M. tuberculosis* dilakukan uji kepekaan terhadap obat antituberkulosis lini pertama (SIRE).

Tabel Hasil OAT lini pertama dengan media LJ dan MGIT 960, n= 38

LJ	MGIT	MDR <sup>a</sup>	Non MDR <sup>b</sup>	Sensitif
MDR <sup>a</sup>		30	0	0
Non MDR <sup>b</sup>		0	4	1
Sensitif <sup>c</sup>		0	1	3

Ket : a. MDR = *Multidrug Resistance*,

b. non MDR = *non Multidrug Resistance* (hanya resisten pada salah satu OAT atau selain Isoniazid dan Rifampisin)

c. isolat sensitif terhadap semua jenis OAT yang diuji

Pada LJ dari 40 isolat didapat 30 isolat yang MDR TB yang kemudian akan dilakukan uji kepekaan terhadap obat lini kedua.

Tabel Hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua, n=30

OAT	Lowenstein Jensen	Hasil Uji Kepekaan BACTEC MGIT 960	
		Sensitif	Resisten
Ofloksasin	Sensitif	26	0
	Resisten	1	3
Amikasin	Sensitif	21	1
	Resisten	0	8
Kanamisin	Sensitif	26	0
	Resisten	0	4

Hasil uji kepekaan OAT lini kedua menggunakan medium LJ menunjukkan bahwa 26 isolat *M. tuberculosis* sensitif dan 4 isolat resisten terhadap ofloksasin, 22 isolat sensitif dan 8 isolat resisten terhadap amikasin. Sementara itu 26 isolat sensitif terhadap kanamisin dan 4 isolat lainnya resisten. Pada uji kepekaan OAT lini kedua menggunakan BACTEC MGIT 960, didapatkan bahwa 27 isolat sensitif dan 3 isolat resisten terhadap ofloksasin, 21 isolat sensitif dan 1 isolat resisten terhadap amikasin. Sedangkan uji kepekaan pada kanamisin adalah 26 isolat sensitif dan 4 isolat resisten

Tabel Sensitifitas dan spesifitas MGIT 960 dibandingkan dengan Lowenstein Jensen

OAT lini kedua	% Sensitifitas	% spesifitas
Ofloksasin	75	100
Amikasin	100	95,4
Kanamisin	100	100

*M. tuberculosis* merupakan bakteri yang pertumbuhannya lama. Pada BACTEC MGIT 960 didapatkan hasil uji kepekaan yang lebih cepat dibandingkan dengan media LJ.

Tabel Waktu uji Kepekaan *M. tuberculosis* terhadap OAT lini kedua

Metode	Rata-rata hasil uji kepekaan
Media LJ	18-28 hari (rata-rata 21 hari)
BACTEC MGIT 960	5-12 hari (rata-rata 9 hari)

## PEMBAHASAN

Pada uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap ofloksasin menggunakan medium LJ didapatkan bahwa 26 isolat (86,6 %) sensitif dan 4 (13,33 %) isolat resisten.

Sedangkan pada uji menggunakan metode BACTEC MGIT 960 didapatkan 27 isolat (90 %) sensitif terhadap ofloksasin dan 3 isolat (10%) resisten. Penelitian Martin (2008) tentang uji kepekaan *M. tuberculosis* menggunakan MGIT manual di Brasil pada 188 isolat menunjukkan hasil 147 isolat(78 %) sensitif dan 41 isolat (21 %) resisten terhadap ofloksasin.<sup>10</sup>

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan ofloksasin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan nilai kappa. Hasil uji kepekaan ofloksasin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 0,835

Pada penelitian ini pada penggunaan amikasin didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifitas 95,4 %. Penelitian yang

dilakukan Kruuner (2005) pada 133 isolat yang dilakukan uji kepekaan amikasin dengan konsentrasi 1 µg/ml menggunakan MGIT 960 menunjukkan hasil 108 isolat (81,20 %) sensitif dan nilai spesifitas uji ini adalah 96 % serta spesifitasnya 99 %. Sensitifitas dan spesifitas MGIT 960 yang tinggi memperlihatkan bahwa MGIT baik untuk uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap amikasin.<sup>11</sup>

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan amikasin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan nilai kappa. Hasil uji kepekaan amikasin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 0,916.

Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin menggunakan MGIT 960 didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifitas 100 %. Penelitian Bastian (2001) tentang uji kepekaan kanamisin pada MGIT dengan konsentrasi kanamisin 5 µg/ml didapat nilai sensitifitas 100 % dan spesifitas 97 % dengan waktu rata-rata hasil uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap kanamisin adalah 5,1 hari.<sup>12,13</sup>

Penentuan seberapa sesuai antara hasil uji kepekaan amikasin menggunakan BACTEC MGIT 960 dengan LJ ditunjukkan dengan nilai kappa. Hasil uji kepekaan amikasin dengan BACTEC MGIT 960 relatif baik dengan nilai kappa sebesar 1.

Medium cair seperti *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) membutuhkan waktu inkubasi kurang lebih 15 hari untuk menumbuhkan *M. tuberculosis*, 1-2 minggu lebih cepat bila dibandingkan pertumbuhannya pada media padat.<sup>14</sup> Pada penelitian ini, uji kepekaan *M.tuberculosis* terhadap OAT lini kedua pada medium LJ membutuhkan waktu 18-28 (rata-rata 21 hari) sedangkan metode BACTEC MGIT 960 akan memberikan sinyal positif pada hari 5-12 (rata-rata 9

hari). Hal ini sesuai dengan Martin(2008) yang mengemukakan bahwa penggunaan media padat dibutuhkan 3 sampai 8 minggu untuk mengetahui strain yang sensitif atau resisten terhadap OAT, sedangkan media cair dapat membantu mempersingkat lamanya pemeriksaan, yaitu 15 hari.

Tidak tersedianya kit komersial OAT lini kedua sepertinya OAT lini pertama yang dikenal sebagai kit SIRE menyebabkan pembuatan larutan kerja obat harus dipersiapkan secara akurat. Kualitas kontrol menggunakan strain H37Rv sebagai kontrol sensitif dan strain yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis lini kedua harus selalu dilakukan untuk meningkatkan keakuratan hasil uji.

Penggunaan BACTEC MGIT 960 untuk uji kepekaan obat anti tuberkulosis mempunyai kelebihan yaitu hasil yang lebih cepat sehingga diharapkan membantu klinisi untuk menentukan terapi yang tepat terhadap penderita MDR TB sehingga dapat mencegah penyebaran MDR secara luas. Selain itu, BACTEC MGIT 960 lebih mahal dan mempunyai tingkat kontaminasi tinggi, untuk mengatasinya dibutuhkan tenaga yang terampil dan kehati-hatian dalam melakukan kerja. Sedangkan LJ sendiri mempunyai kelebihan yaitu mudah, murah dan dapat dilakukan pada laboratorium dengan peralatan terbatas.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. *Tuberculosis*. Diunduh dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>. Diakses tanggal 3 Mei 2009
2. *Lembar Fakta TB*. Diunduh dari [www.tbindonesia.or.id/pdf/Lembar\\_Fakta\\_TB.pdf](http://www.tbindonesia.or.id/pdf/Lembar_Fakta_TB.pdf). Diakses tanggal 3 Mei 2009.
3. TB factsheet Indonesia. Diunduh dari [www.tbindonesia.or.id/pdf/TB factsheet Indonesia](http://www.tbindonesia.or.id/pdf/TB_factsheet_Indonesia). Diakses tanggal 3 Mei 2009.
4. Ardito, F, B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti and G. Fadda. 2001. *Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 39(12):4440-44
5. Diunduh dari [www.who.int/tb/publications/2008/drs\\_report4\\_26feb08.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf)
6. Sjahrurachman, Agus. 2008. Kultur dan uji kepekaan M. tuberculosis terhadap obat anti tuberkulosis lini pertama. Departemen Kesehatan RI.
7. SOP BACTEC MGIT 960 SIRE Kit, Uji Kepekaan Obat Anti Tuberculosis. Lab. Mikrobiologi Klini FKUI
8. Policy Guidance on Drug Susceptibility Testing (DST) of Second-line Anti-Tuberculosis Drugs, Final Draft. Geneva, October 2007.
9. Protokol pemeriksaan uji resistensi berdasarkan Guidelines for drugs susceptibility Testing For Second-Line anti Tuberculosis for Dots-Plus tahun 2001
10. Martin, A, A. von Groll, K. Fissette, J.C Palomino, F. Varaine, and F. Portaels. 2008. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis Resistance to Second-Line Drugs by Use of the Manual Mycobacterium Growth Indicator Tube System*. J. Clin. Microbiol. 46(12); 3952-3956.
11. Kruuner, A., M.D. Yates, F. Drobniewski. 2006. *Evaluation of MGIT 960-based Antimicrobial Testing of Critical Concentration of first and Second-Line Antimicrobial Drugs with Drug Resistant Clinical Strain of M. tuberculosis*. J. Clin. Microbiol 44(3): 811-818
12. Bastian, I., L. Rigouts, J. C. Palomino, and F. Portaels. 2001. *Kanamycin susceptibility testing of Mycobacterium*

- tuberculosis using Mycobacterium Growth Indicator Tube and a colorimetric method.* Antimicrob. Agents Chemother. 45:1934–1936.
13. Rusch-Gerdes, S, G.E Pfyffer, M. Casal, M. Chadwick, and S. Sidiqi. 2006. *Multicenter Laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for Testing Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to Classical Second-Line drugs and Newer Antimicrobials.* J. Clin. Microbiol 44(3): 688-692.
14. Rishi, S, P Sinha, B Malhotra, N Pal. 2007. *A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination.* Indian J. Med. Microbiol. 25(4): 383-6

