

**PROSEDUR
LABORATORIUM DASAR**
untuk
BAKTERIOLOGI KLINIS

Kutipan Pasal 72:**Sanksi Pelanggaran Undang-Undang Hak Cipta
(Undang-Undang No. 19 Tahun 2002)**

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp.1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

PENTING DIKETAHUI

Penerbit adalah rekanan pengarang untuk menerbitkan sebuah buku. Bersama pengarang, penerbit menciptakan buku untuk diterbitkan. Penerbit mempunyai hak atas penerbitan buku tersebut serta distribusinya, sedangkan pengarang memegang hak penuh atas karangannya dan berhak mendapatkan royalti atas penjualan bukunya dari penerbit.

Percetakan adalah perusahaan yang memiliki mesin cetak dan menjual jasa pencetakan. Percetakan tidak memiliki hak apa pun dari buku yang dicetaknya kecuali upah. Percetakan tidak bertanggung jawab atas isi buku yang dicetaknya.

Pengarang adalah pencipta buku yang menyerahkan naskahnya untuk diterbitkan di sebuah penerbit. Pengarang memiliki hak penuh atas karangannya, namun menyerahkan hak penerbitan dan distribusi bukunya kepada penerbit yang ditunjuknya sesuai batas-batas yang ditentukan dalam perjanjian. Pengarang berhak mendapatkan royalti atas karyanya dari penerbit, sesuai dengan ketentuan di dalam perjanjian Pengarang-Penerbit.

Pembajak adalah pihak yang mengambil keuntungan dari kepakaran pengarang dan kebutuhan belajar masyarakat. Pembajak tidak mempunyai hak mencetak, tidak memiliki hak menggandakan, mendistribusikan, dan menjual buku yang digandakannya karena tidak dilindungi *copyright* ataupun perjanjian pengarang-penerbit. Pembajak tidak peduli atas jerih payah pengarang. Buku pembajak dapat lebih murah karena mereka tidak perlu mempersiapkan naskah mulai dari pemilihan judul, editing sampai persiapan pracetak, tidak membayar royalti, dan tidak terikat perjanjian dengan pihak mana pun.

PEMBAJAKAN BUKU ADALAH KRIMINAL!

Anda jangan menggunakan buku bajakan, demi menghargai jerih payah para pengarang yang notabene adalah para guru.

PROSEDUR LABORATORIUM DASAR

untuk

BAKTERIOLOGI KLINIS

(Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology)

EDISI 2

J. Vandepitte & J. Verhaegen

*Department of Microbiology
St Rafaël Academic Hospital
Leuven, Belgium*

K. Engbaek

*Department of Clinical Microbiology
University of Copenhagen
Herlev Hospital
Herlev, Denmark*

P. Rohner

*Department of Clinical Microbiology
Cantonal University Hospital
Geneva, Switzerland*

P. Piot

*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
Geneva, Switzerland*

C. C. Heuck

*World Health Organization
Geneva, Switzerland*

Alih Bahasa:

dr. Lyana Setiawan

Editor Edisi Bahasa Indonesia:

dr. Diana Susanto

PENERBIT BUKU KEDOKTERAN



EGC

EGC 1700

Diterbitkan oleh World Health Organization pada 2003

Dengan judul **BASIC LABORATORY PROCEDURES IN CLINICAL BACTERIOLOGY, 2nd Ed.**

World Health Organization © 2003

Direktur Jenderal World Health Organization memberikan hak terjemahan untuk edisi bahasa Indonesia kepada Penerbit Buku Kedokteran EGC, menjadi satu-satunya pihak yang bertanggung jawab untuk edisi Indonesia.

PROSEDUR LABORATORIUM DASAR UNTUK BAKTERIOLOGI KLINIS, Ed. 2

Alih bahasa: dr. Lyana Setiawan

Editor edisi bahasa Indonesia: dr. Diana Susanto

Hak cipta terjemahan Indonesia

© 2005 Penerbit Buku Kedokteran EGC

P.O. Box 4276/Jakarta 10042

Telepon: 6530 6283

Anggota IKAPI

Desain kulit muka: Agus Prabowo

Penata letak: M. Azis Asmarokondi

Hak cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip, memperbanyak dan menerjemahkan sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit.

Cetakan 2011

Perpustakaan Nasional: Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Prosedur laboratorium dasar untuk bakteriologi klinis / penulis, J. Vandepitte ... [et al.] ; alih bahasa, Lyana Setiawan ; editor edisi bahasa Indonesia, Diana Susanto. — Ed. 2. — Jakarta : EGC, 2010. viii, 143 hlm. ; 21 x 29,5 cm.

Judul asli: *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.*

ISBN 978-979-044-000-5

I. Bakteriologi. I. Lyana Setiawan. II. Diana Susanto.

616.920 1



Isi di luar tanggung jawab percetakan

Daftar isi

Kata pengantar	viii
Pendahuluan	1
Pemantapan mutu dalam bidang bakteriologi	2
Pendahuluan	2
Definisi	2
Pengendalian mutu internal	6
Penilaian mutu eksternal	16
 BAGIAN I	
Pemeriksaan bakteriologis	19
 Darah	20
Pendahuluan	20
Kapan dan di mana bakteremia dapat terjadi	20
Pengambilan darah	20
Media biakan darah	22
Pengerjaan biakan darah	23
 Cairan serebrospinal	25
Pendahuluan	25
Pengambilan dan transpor spesimen	25
Pemeriksaan makroskopik	25
Pemeriksaan mikroskopik	26
Identifikasi awal	28
Uji kepekaan	28
 Urine	29
Pendahuluan	29
Pengambilan bahan	29
Biakan dan interpretasi	30
Interpretasi hasil biakan urine kuantitatif	33
Identifikasi	34
Uji kepekaan	34
 Tinja	35
Pendahuluan	35
Agen penyebab dan gambaran klinis	35
Penggunaan sumber daya laboratorium secara tepat	37
Pengambilan dan transpor spesimen tinja	37
Pemeriksaan visual spesimen tinja	38
Pengayaan (<i>enrichment</i>) dan inokulasi spesimen tinja	39

Media untuk patogen enterik	39
Isolasi primer	40
Identifikasi isolat tahap awal	41
Identifikasi mikrobiologis tahap akhir	48
Identifikasi serologis	52
Infeksi saluran napas atas	58
Pendahuluan	58
Flora normal faring	58
Agen bakteri faringitis	59
Pengambilan dan pengiriman spesimen	60
Pemeriksaan mikroskopi langsung	60
Biakan dan identifikasi	60
Uji kepekaan	62
Infeksi saluran napas bawah	63
Pendahuluan	63
Infeksi-infeksi tersering	63
Pengumpulan spesimen dahak	64
Pengerjaan dahak dalam laboratorium (untuk infeksi non-tuberkulosis)	65
Biakan untuk <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68
Interpretasi biakan untuk <i>M. tuberculosis</i>	70
Panduan umum untuk keamanan	70
Penyakit menular seksual	72
Pendahuluan	72
Uretritis pada pria	73
Spesimen genital dari wanita	75
Spesimen dari tukak genital	77
Eksudat purulen, luka dan abses	81
Pendahuluan	81
Keadaan klinis yang sering ditemukan dan agen penyebab tersering	81
Pengambilan dan pengiriman spesimen	83
Penilaian makroskopik	84
Pemeriksaan mikroskopik	85
Biakan	86
Identifikasi	87
Uji kepekaan	91
Bakteriologi anaerob	92
Pendahuluan	92
Deskripsi bakteri sehubungan dengan kebutuhan oksigen	92
Bakteriologi	92
Uji kepekaan antimikroba	97
Pendahuluan	97
Prinsip umum pada uji kepekaan antimikroba	97
Definisi klinis istilah "resisten" dan "peka": sistem tiga kategori	98
Indikasi uji kepekaan rutin	99
Pemilihan obat untuk uji kepekaan rutin di laboratorium klinis	101

Metode modifikasi Kirby-Bauer	103
Uji kepekaan langsung versus tidak langsung	110
Faktor-faktor teknis yang mempengaruhi ukuran zona pada metode difusi-cakram	110
Kendali mutu	113
Uji serologis	115
Pendahuluan	115
Langkah-langkah kendali mutu	115
Reaksi serologis	117
Uji serologis untuk sifilis	119
Uji aglutinin pada demam (<i>Febrile agglutinins test</i>)	124
Uji anti-streptolisin O (ASO)	127
Uji antigen bakteri	129
 BAGIAN II	
Media dan reagen yang esensial	131
 Pendahuluan	132
 Patogen, media, dan reagen diagnostik	133
Darah	134
Cairan serebrospinal	134
Urine	135
Tinja	136
Saluran napas atas	137
Saluran napas bawah	138
Spesimen urogenital untuk eksklusi penyakit menular seksual (PMS)	138
Pus dan eksudat	139
Daftar media dan reagen diagnostik yang dianjurkan untuk laboratorium mikrobiologi tingkat menengah	140
 Bacaan lanjutan terpilih	143

Kata pengantar

Penyakit menular adalah penyebab kematian terbanyak di negara berkembang, dan diagnosis serta pengobatannya merupakan tantangan besar bagi pelayanan kesehatan di daerah tersebut. Organisasi Kesehatan Dunia sudah sejak lama terlibat secara aktif dalam mengembangkan dan mempromosikan teknik-teknik baku untuk pemeriksaan laboratorium pada penyakit-penyakit tersebut, dengan upaya pertama pembakuan uji kepekaan patogen bakteri dilakukan pada tahun 1960.¹ Setelah itu, pada tahun 1976, Komite Ahli WHO mengenai Pembakuan Biologis (*WHO Expert Committee on Biological Standardization*) menyusun persyaratan untuk uji kepekaan antibiotik dengan metode cakram.²

Pada saat bersamaan, dilakukan pula upaya untuk memperkenalkan pengawasan mutu dalam kinerja laboratorium. Pada tahun 1981, WHO menetapkan suatu Skema Pengawasan Mutu Eksternal Internasional untuk Mikrobiologi (*International External Quality Assurance Scheme for Microbiology*). Laboratorium-laboratorium yang terlibat dalam skema ini dapat memainkan peran utama dalam penerapan skema-skema pengkajian mutu nasional pada semua tingkat sistem pelayanan kesehatan.

Publikasi saat ini menyatukan dan memperbaharui berbagai pedoman yang dihasilkan oleh WHO selama bertahun-tahun mengenai pengambilan contoh spesimen untuk pemeriksaan laboratorium, identifikasi bakteri, dan uji resistensi antimikroba. Keterangan yang tercantum dimaksudkan untuk mengarah pada harmonisasi pemeriksaan mikrobiologis dan uji kepekaan, serta untuk memperbaiki mutu laboratorium baik pada tingkat pusat maupun menengah. Panduan ini lebih memusatkan pada prosedur yang harus diikuti daripada teknik-teknik dasar mikroskopi dan pewarnaan, yang dijabarkan secara rinci dalam publikasi WHO lainnya.³

¹ *The public health aspects of antibiotics in feedstuffs. Report on a Working Group, Bremen, 1-5 October 1973.* Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 1973 (document no. EURO 3604 (2)).

² *WHO Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-eighth report.* Geneva, World Health Organization, 1977 (WHO Technical Report Series, No. 810).

³ *Manual of basic techniques for a health laboratory*, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2003.

Pendahuluan

Penyakit menular terus bertanggung jawab atas bagian yang teramat besar dari anggaran kesehatan negara-negara berkembang. Menurut *The world health report*,¹ diare akut bertanggung jawab atas sebanyak 2,2 juta kematian per tahun. Infeksi saluran napas akut (terutama pneumonia) adalah penyebab kematian lainnya yang penting, yang menyebabkan sekitar 4 juta kematian per tahun. Analisis data aspirat paru mengisyaratkan bahwa di negara berkembang bakteri-bakteri seperti *Haemophilus influenzae* dan *Streptococcus pneumoniae*, merupakan patogen yang dominan pada pneumonia anak dibandingkan virus. *H. influenzae* dan *S. pneumoniae* penghasil β -laktamase yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap bensilpenisilin telah muncul di berbagai bagian dunia, menjadikan pengawasan terhadap patogen-patogen tersebut semakin penting.

Penyakit menular seksual semakin meningkat. Masih terdapat ancaman terjadinya epidemi dan pandemi yang disebabkan oleh virus atau bakteri, yang makin dimungkinkan oleh tidak cukupnya pengawasan epidemiologis dan kurangnya tindakan pencegahan. Untuk mencegah dan mengendalikan penyakit-penyakit bakterial utama, perlu dikembangkan perangkat-perangkat sederhana untuk digunakan dalam pengawasan epidemiologis dan pemantauan penyakit, sebagaimana juga teknik-teknik diagnostik yang disederhanakan dan terpercaya.

Untuk menghadapi tantangan yang disebabkan oleh keadaan ini, pelayanan laboratorium kesehatan harus berdasarkan pada jaringan laboratorium yang melaksanakan pekerjaan diagnostik mikrobiologis untuk pusat-pusat kesehatan, dokter rumah sakit, serta ahli epidemiologi. Kerumitan pekerjaan ini akan meningkat dari laboratorium perifer ke laboratorium menengah dan pusat. Hanya dengan cara ini dimungkinkan untuk mengumpulkan informasi relevan yang cukup dalam waktu singkat untuk meningkatkan pengawasan, serta memungkinkan pengenalan dini adanya epidemi infeksi yang tidak biasa dan pengembangan, penerapan serta evaluasi langkah-langkah intervensi yang spesifik.

¹*The world health report 2000*. Geneva, World Health Organization, 2000.

Pemantapan mutu dalam bidang bakteriologi

Pendahuluan

Program pemantapan mutu adalah cara yang efisien untuk mempertahankan standar kinerja laboratorium diagnostik, dan bila perlu untuk meningkatkan standar tersebut. Dalam mikrobiologi, mutu berada di atas kesempurnaan teknis, sehingga turut mempertimbangkan faktor kecepatan, biaya, dan kegunaan atau relevansi klinis suatu pemeriksaan. Pemeriksaan laboratorium umumnya mahal dan, dengan majunya ilmu kedokteran, pemeriksaan laboratorium cenderung memboroskan semakin banyak anggaran kesehatan.

Definisi

Supaya bermutu baik, suatu uji diagnostik haruslah relevan secara klinis, dalam arti uji tersebut harus membantu pencegahan atau pengobatan penyakit. Ukuran lain mutu suatu uji diagnostik adalah:

- *Ketepatan*: Apakah hasilnya benar?
- *Keterulangan (reproducibility)*: Apakah didapatkan hasil yang sama jika uji diulang?
- *Kecepatan*: Apakah uji tersebut cukup cepat untuk dapat digunakan dokter dalam meresepkan pengobatan?
- *Rasio biaya-keuntungan*: Apakah biaya uji tersebut masuk akal jika dikaitkan dengan keuntungan bagi pasien dan komunitas?

Faktor-faktor yang mempengaruhi ketepatan dan keterulangan hasil laboratorium

Sumber-sumber kesalahan dapat mencakup hal-hal berikut ini.

- *Petugas*. Kinerja pekerja laboratorium atau analis berhubungan langsung dengan mutu pendidikan dan pelatihan yang didupakannya, pengalaman orang tersebut, serta kondisi pekerjaan.
- *Faktor lingkungan*. Ruang kerja, pencahayaan, atau ventilasi yang tidak adekuat, suhu yang ekstrim, tingkat kebisingan yang berlebihan, atau kondisi kerja yang tidak aman dapat mempengaruhi hasil.
- *Spesimen*. Cara dan waktu pengambilan bahan serta sumber spesimen sering kali berada di luar kendali langsung laboratorium, tetapi berpengaruh langsung pada kemampuan laboratorium untuk mendapat hasil yang terpercaya. Faktor-faktor lain yang dapat dikendalikan laboratorium dan yang mempengaruhi mutu adalah transpor, identifikasi, penyimpanan, serta persiapan (pengerjaan) spesimen. Oleh karena itu, laboratorium berperan dalam mendidik mereka yang mengambil dan mengirim spesimen. Instruksi tertulis harus tersedia dan ditinjau secara teratur bersama staf klinik dan perawat.
- *Bahan-bahan laboratorium*. Mutu reagen, bahan kimia, alat dari kaca, zat warna, media biakan serta hewan laboratorium semuanya mempengaruhi ketepatan hasil laboratorium.
- *Metode pemeriksaan*. Beberapa metode lebih terpercaya dibandingkan metode lain.
- *Perlengkapan*. Kurangnya perlengkapan atau penggunaan alat-alat di bawah standar atau yang tidak dirawat dengan baik akan memberikan hasil yang kurang dapat dipercaya.
- *Pemeriksaan dan pembacaan*. Pembacaan hasil yang terburu-buru, atau kurangnya jumlah lapang pandang mikroskop yang diperiksa, dapat menyebabkan kesalahan.

- *Pelaporan.* Kesalahan penyalinan, atau laporan yang tidak lengkap, akan menimbulkan masalah.

Mutu interpretasi hasil uji

Interpretasi sangat penting dalam mikrobiologi. Pada setiap tahap pemeriksaan spesimen, hasil yang ada harus diinterpretasikan agar dapat dipilih uji yang optimum, dalam hal kecepatan dan ketepatan, untuk tahap pemeriksaan berikutnya.

Pemantapan mutu dalam laboratorium mikrobiologi

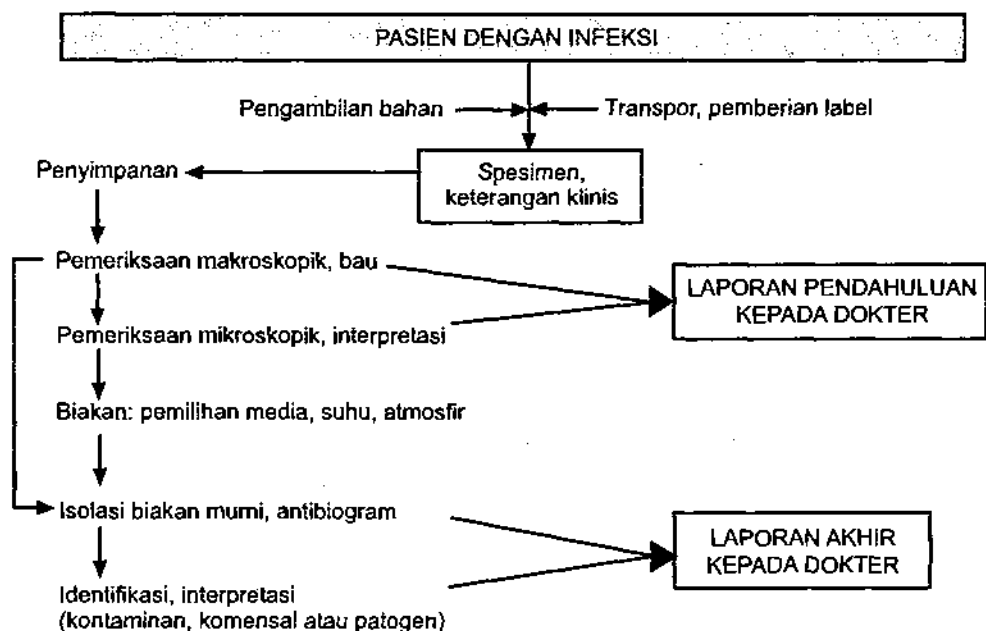
Pemantapan mutu adalah ringkasan seluruh aktivitas yang melibatkan laboratorium untuk memastikan bahwa hasil-hasil uji bermutu baik. Pemantapan mutu haruslah:

- *menyeluruh:* mencakup semua tahap dalam siklus, mulai dari pengambilan spesimen sampai pengiriman hasil akhir ke dokter (Gbr. 1);
- *rasional:* memusatkan pada tahap-tahap yang paling kritis dalam siklus tersebut;
- *berkala:* menyediakan pemantauan prosedur uji secara berkesinambungan;
- *sering:* untuk mendeteksi dan membetulkan kesalahan jika ada.

PELAYANAN LABORATORIUM BERMUTU BAIK BERARTI KEDOKTERAN BERMUTU BAIK

Pemantapan mutu membantu memastikan bahwa uji yang mahal digunakan seekonomis mungkin; selain juga menentukan apakah uji-uji yang baru—sahih atau tidak berguna, memperbaiki kinerja laboratorium klinis dan laboratorium kesehatan masyarakat, serta membantu menjadikan hasil-hasil yang didapat dari laboratorium yang berbeda sebanding.

Gambar. 1 Tahap-tahap dalam pemeriksaan laboratorium pada pasien terinfeksi



WHO 90960

Jenis-jenis pemantapan mutu

Terdapat dua jenis pemantapan mutu: internal dan eksternal

- *Internal*. Ini disebut KENDALI MUTU (*Quality Control*). Setiap laboratorium mempunyai program untuk memeriksa mutu uji-ujinya sendiri.

Secara ideal pengendalian mutu internal mencakup:

- pemantauan mutu uji secara *berkesinambungan*;
- pemeriksaan *menyeluruh* pada semua tahap, mulai dari pengambilan bahan (jika mungkin) sampai pengiriman laporan akhir.

Laboratorium mempunyai tanggung jawab etik kepada pasien untuk memberikan hasil yang akurat dan bermakna.

KENDALI MUTU INTERNAL MUTLAK DIPERLUKAN UNTUK PROSEDUR PELAKSANAAN YANG BAIK

- *Eksternal*. Ini disebut PENILAIAN MUTU (*Quality Assessment*). Kinerja laboratorium dikendalikan oleh suatu agen eksternal. Di beberapa negara, partisipasi bersifat wajib (diatur oleh pemerintah) dan diperlukan untuk lisensi.

Penilaian mutu eksternal mencakup:

- pemantauan mutu uji secara periodik;
- pemeriksaan sewaktu untuk uji identifikasi, dan kadang-kadang untuk teknik isolasi.

Kriteria mutu dalam mikrobiologi

Relevansi klinis

Salah satu kriteria mutu yang penting untuk uji mikrobiologis adalah seberapa besar kontribusinya pada pencegahan atau pengobatan penyakit menular; ini disebut relevansi klinis. Relevansi klinis hanya dapat dipastikan jika terdapat komunikasi yang baik antara klinisi dan laboratorium.

Berikut ada beberapa contoh untuk menjelaskan relevansi klinis.

1. Jika beberapa koloni batang Gram negatif terisolasi dari sputum atau apusan tenggorok seorang pasien yang dirawat, identifikasi lebih lanjut dan antibiogram tidak mempunyai relevansi klinis karena kedua prosedur tersebut tidak akan mempengaruhi pengobatan pasien.
2. Jika terisolasi *Streptococcus pyogenes*, antibiogram lengkap tidak mempunyai relevansi klinis karena penisilin merupakan obat pilihan, dan selalu aktif secara *in vitro*.
3. Jika *Escherichia coli* terisolasi pada suatu kasus sporadik diare tanpa darah (*non-bloody diarrhoea*), identifikasi serotipe tidak mempunyai relevansi klinis karena tidak terdapat hubungan yang jelas antara serotipe dan patogenisitas.
4. Jika apusan dengan pewarnaan Gram menunjukkan "flora anaerob campuran", identifikasi rutin untuk anaerob tidak mempunyai relevansi klinis. Identifikasi rutin ini menghabiskan waktu dan biaya, dan tidak akan mempengaruhi pengobatan pasien.
5. Jika sel ragi terisolasi dari spesimen saluran napas, harus dilakukan uji identifikasi untuk *Cryptococcus*. Uji identifikasi lanjutan tidak mempunyai relevansi klinis karena tidak akan mempengaruhi penatalaksanaan pasien.

Singkatnya, uji yang bermutu baik adalah uji yang akurat dan memberi hasil yang berguna untuk pencegahan atau pengobatan infeksi. Tidak perlu mengisolasi dan mengidentifikasi semua jenis organisme yang berbeda dalam bahan uji.

Ketepatan

Untuk uji-uji yang memberi hasil kuantitatif, ketepatan diukur berdasarkan seberapa dekat hasil-hasil terhadap nilai sebenarnya. Beberapa contoh uji semacam ini adalah:

- pemeriksaan antibiotik dalam serum,
- pengukuran nilai konsentrasi hambatan minimal (KHM) antibiotik *in vitro*,
- titrasi antibodi serum.

Untuk uji-uji yang memberikan hasil kualitatif, ketepatan ditentukan dengan menilai apakah hasilnya benar. Beberapa contoh uji semacam ini adalah:

- identifikasi patogen
- uji kepekaan antibiotik isolat dengan metode cakram

Terminologi baku untuk mikroorganisme sangat memerlukan ketepatan. Tata nama yang diakui secara internasional harus selalu digunakan. Sebagai contoh: *Staphylococcus aureus*, BUKAN “stafilokokus patogenik”; *Streptococcus pyogenes*, BUKAN “streptokokus hemolitik”.

Penggunaan metode yang seragam dan diakui sangat penting. Sebagai contoh, uji kepekaan dengan cakram harus dilakukan dengan teknik yang diakui secara internasional, seperti uji Kirby-Bauer yang telah dimodifikasi (hal. 102).

Keterulangan

Keterulangan atau presisi suatu uji mikrobiologis berkurang karena dua hal:

1. *kurang homogen*. Suatu bahan tunggal dari seorang pasien dapat mengandung lebih dari satu organisme. Oleh karena itu, pada biakan ulang mungkin diisolasi organisme yang berbeda.
2. *kurang stabil*. Dengan berjalannya waktu, mikroorganisme dalam suatu spesimen akan berkembang biak atau mati dengan kecepatan yang berbeda. Oleh karena itu, pada biakan ulang mungkin diisolasi organisme yang berbeda. Jadi, untuk meningkatkan ketelitian, bahan harus diperiksa sesegera mungkin setelah pengambilan.

Efisiensi

Efisiensi suatu uji mikrobiologis adalah kemampuannya memberi diagnosis yang tepat mengenai suatu patogen atau keadaan patologis. Ini diukur dengan dua kriteria:

1. *Sensitivitas diagnostik*

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{jumlah total hasil positif}}{\text{jumlah total pasien yang terinfeksi}}$$

Makin besar sensitivitas uji, makin sedikit jumlah hasil negatif palsu.

Sebagai contoh, sensitivitas agar MacConkey rendah untuk isolasi *Salmonella typhi* dari tinja. Patogen enterik yang penting ini seringkali terlewatkan karena pertumbuhan berlebihan bakteri usus non-patogen.

2. *Spesifisitas diagnostik*

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{jumlah total hasil negatif}}{\text{jumlah total pasien yang tidak terinfeksi}}$$

Makin besar spesifisitas uji, makin sedikit jumlah hasil positif palsu.

Sebagai contoh:

- Pewarnaan Ziehl-Neelsen untuk sputum sangat spesifik untuk diagnosis tuberkulosis karena hasil positif palsu hanya sedikit.
- Pewarnaan Ziehl-Neelsen pada urin amat kurang spesifik karena memberikan banyak hasil positif palsu (akibat adanya mikobakterium atipik).
- Uji Widal mempunyai spesifisitas yang rendah dalam diagnosis demam tifoid karena antibodi yang bereaksi silang, sisa infeksi serotipe salmonella terkait sebelumnya, memberikan hasil positif palsu.

Sensitivitas dan spesifisitas suatu uji saling berkaitan. Dengan menurunkan batasan diskriminasi, sensitivitas suatu uji dapat ditingkatkan dengan mengorbankan spesifisitasnya, demikian pula sebaliknya. Sensitivitas dan spesifisitas suatu uji juga terkait dengan prevalensi infeksi tersebut dalam populasi yang diteliti.

Pengendalian mutu internal

Persyaratan

Suatu program pengendalian mutu internal haruslah praktis, realistis, dan ekonomis.

Suatu program pengendalian mutu internal janganlah mencoba menilai setiap prosedur, reagen, dan media biakan pada setiap hari kerja. Program tersebut haruslah menilai setiap prosedur, reagen, dan media biakan sesuai rencana pemakaian, berdasarkan pentingnya tiap-tiap hal bagi mutu pemeriksaan sebagai suatu kesatuan.

Prosedur

Pengendalian mutu internal dimulai dengan pelaksanaan laboratorium yang benar.

Buku pegangan operasional laboratorium

Setiap laboratorium harus mempunyai buku pegangan operasional yang meliputi topik-topik:

- pembersihan tempat kerja,
- higiene pribadi,
- peringatan keselamatan, (*safety precaution*)
- tempat makan dan merokok khusus di luar laboratorium,
- penanganan dan pembuangan bahan yang terinfeksi,
- vaksinasi yang sesuai untuk pekerja, misalnya hepatitis B,
- perawatan peralatan,
- pengambilan bahan,
- pencatatan bahan,
- eliminasi bahan yang tidak sesuai,
- pengerjaan bahan,
- pencatatan hasil,
- pelaporan hasil.

Buku pegangan operasi harus diikuti dengan cermat, serta direvisi dan diperbarui secara teratur.

Perawatan peralatan

Peralatan laboratorium haruslah dirawat dengan baik. Uji mutu yang baik tidak dapat dilakukan jika peralatan yang digunakan bermutu rendah atau tidak terpelihara dengan baik.

Tabel 1 adalah penjadwalan perawatan rutin dan pemeliharaan peralatan yang esensial. Suhu kerja alat dapat dicatat dalam formulir seperti yang ditunjukkan pada Gbr. 2.

Media biakan

Media biakan dapat dibuat di laboratorium dari bahan-bahan dasar atau dari bubuk kering yang tersedia secara komersial, atau dapat dibeli siap pakai. Bubuk kering komersial dianjurkan karena ekonomis untuk diangkut dan disimpan, dan mutunya kemungkinan lebih tinggi daripada media yang dibuat di laboratorium. Untuk hasil terbaik, perlu perhatian lebih pada poin-poin berikut.

Pemilihan media

Laboratorium yang efisien menyimpan sesedikit mungkin jenis media yang konsisten dengan jenis pemeriksaan yang dikerjakan. Sebagai contoh, bahan dasar agar yang baik dapat digunakan sebagai media serbaguna untuk membuat agar darah, agar coklat dan beberapa media selektif.

Tabel 1. Kendali mutu peralatan

Peralatan	Perawatan rutin	Pemantauan	Pemeliharaan dan inspeksi teknis
Botol anaerob (<i>anaerobic jar</i>)	Bersihkan bagian dalam botol setiap minggu Aktifkan kembali katalis setiap habis digunakan (160° C, 2 jam) Ganti katalis tiap 3 bulan	Gunakan carik indikator biru metilen setiap kali penggunaan Perhatikan dan catat waktu terjadinya perubahan warna pada indikator setiap minggu	Periksalah segel penyekat pada tutup setiap minggu
Autoklaf	Bersihkan dan ganti air setiap bulan	Periksa dan sesuaikan tinggi air sebelum setiap penggunaan Catat waktu dan suhu atau tekanan setiap kali digunakan Catat kinerja dengan carik spora setiap minggu	Tiap 6 bulan
Sentrifus	Lap dinding dalam dengan larutan antiseptik setiap minggu atau setelah ada tabung kaca yang pecah atau tumpah		Oven udara panas untuk sterilisasi alat gelas
Oven udara panas untuk sterilisasi alat gelas	Bersihkan bagian dalamnya setiap bulan	Catat waktu dan suhu setiap kali penggunaan	Setiap 6 bulan
Inkubator	Bersihkan dinding dalam dan rak-raknya setiap bulan	Catat suhu pada setiap permulaan hari kerja (yang diperbolehkan $35 \pm 1^\circ \text{C}$)	Setiap 6 bulan
Mikroskop	Lap lensa dengan kertas tisu atau kertas lensa setiap akhir hari kerja Bersihkan dan lumasi alas mekanik setiap minggu Lindungi dengan sarung jika tidak digunakan	Periksa kesejajaran kondensor setiap bulan Tempatkan cakram silika biru di bawah sarung mikroskop untuk mencegah pertumbuhan jamur pada udara lembab	Setiap tahun
Lemari pendingin	Bersihkan dan cairkan bunga es setiap 2 bulan dan setelah mati lampu	Catat suhu setiap pagi (yang diperbolehkan $2-8^\circ \text{C}$)	Setiap 6 bulan
Penangas air	Lap dinding dalam dan ganti air setiap bulan	Periksa tinggi air setiap hari Catat suhu pada hari pertama setiap minggu (yang diperbolehkan $55-57^\circ \text{C}$)	Setiap 6 bulan

Gambar 2. Catatan suhu operasi alat

Alat _____ Suhu _____
 Ruang _____
 Baca setiap hari. Periksa apakah petunjuk suhu dapat diterima. Jika menyimpang, catat suhu pada tempatnya.

Tgl.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	Mei	Juni	Juli	Agt.	Sep.	Okt.	Nov.	Des.	Tgl.
1													1
2													2
3													3
4													4
5													5
6													6
7													7
8													8
9													9
10													10
11													11
12													12
13													13
14													14
15													15
16													16
17													17
18													18
19													19
20													20
21													21
22													22
23													23
24													24
25													25
26													26
27													27
28													28
29													29
30													30
31													31

Satu media yang sangat selektif (agar *Salmonella-Shigella* atau agar deoksikolat sitrat) dan satu media yang kurang selektif (agar MacConkey) diperlukan untuk isolasi Enterobacteriaceae patogen dari tinja.

Harus ditambahkan satu media biakan khusus untuk menumbuhkan *Campylobacter spp.*

Pemesanan dan penyimpanan media yang dikeringkan

1. Pesanlah media dengan jumlah yang akan habis terpakai dalam 6 bulan, atau paling lama 1 tahun.
2. Semua bahan harus dikemas dalam wadah yang akan habis dipakai dalam 1–2 bulan.
3. Pada saat diterima, kencangkan tutup semua wadah. Media yang dikeringkan menyerap air dari udara. Pada iklim yang lembab, segel tutup wadah media yang dikeringkan dengan lilin parafin (isi rongga antara tutup dan wadah dengan lilin cair, dan biarkan mengeras).
4. Tuliskan tanggal penerimaan pada tiap wadah.
5. Simpan di tempat yang gelap, sejuk, dengan aliran udara yang baik.
6. Rotasikan persediaan sehingga bahan yang lebih lama lebih dahulu dipakai.
7. Pada saat membuka suatu wadah, tuliskan tanggal dibukanya pada wadah tersebut.
8. Buang semua media kering yang sudah menggumpal atau berubah warna menjadi gelap.
9. Buatlah catatan tertulis tentang media yang tersedia.

Persiapan media

1. Ikuti petunjuk pabrik untuk persiapan dengan seksama.
2. Siapkan media dalam jumlah yang habis dipakai sebelum waktu penyimpanan kadaluarsa (lihat di bawah).

Penyimpanan media yang sudah dibuat

1. Lindungi dari cahaya matahari
2. Lindungi dari panas. Media yang mengandung darah, bahan aditif organik lain atau antibiotik harus disimpan dalam lemari pendingin.
3. Bila disimpan di tempat yang sejuk dan gelap umur penyimpanan media-jadi akan bergantung pada jenis wadah yang digunakan. Waktu simpan yang umum adalah:
 - tabung dengan sumbat kapas, 3 minggu;
 - tabung dengan tutup kendur, 2 minggu;
 - tabung dengan tutup ulir, 3 bulan;
 - cawan Petri, bila disegel dalam kantung plastik, 4 minggu.

Kendali-mutu media-jadi

1. *Pengujian pH.* pH media yang dipersiapkan tidak perlu diperiksa secara rutin bila dibuat secara benar dari bubuk kering. Jika media dibuat dari bahan dasar, media tersebut harus dibiarkan mendingin terlebih dahulu sebelum pH-nya diuji. Media padat harus diuji dengan elektroda permukaan atau setelah maserasi dalam air suling. Jika pH-nya berbeda lebih dari 0,2 unit dari spesifikasinya, sesuaikan dengan asam atau basa atau buat *batch* baru.
2. *Pengujian sterilitas.* Jalankanlah uji sterilitas rutin pada media yang telah ditambahkan darah atau komponen lain setelah diautoklaf. Ambil 3–5% dari setiap batch dan inkubasi pada suhu 35° C selama 2 hari. Sisanya disimpan dalam lemari pendingin. Jika didapatkan lebih dari dua koloni pada setiap plat, buang seluruh *batch* tersebut.
3. *Pengujian kinerja.* Laboratorium harus mempunyai serangkaian galur stok untuk memantau kinerja media. Satu daftar galur stok yang dianjurkan dapat dilihat pada Tabel 2. Galur-galur ini dapat diperoleh dari kerja rutin, atau dari sumber komersial atau sumber resmi. Rekomendasi untuk pemeliharaan dan penggunaan galur stok terdapat pada halaman 14.

Daftar uji–kinerja media-media yang sering digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Galur stok yang dianjurkan pada kendali mutu^a

Kokus Gram positif <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212 atau 33186) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Organisme Gram negatif yang sukar tumbuh (fastidious) <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipe b β -laktamase negatif β -laktamase positif <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> Kuman anaerob <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i>	Enterobacteriaceae <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> Batang Gram negatif lainnya <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>Vibrio cholerae</i> (non-01) Jamur <i>Candida albicans</i>
---	--

^a Hendaknya dipilih galur-galur yang paling relevan dengan kebutuhan laboratorium.

Tabel 3. Uji-kinerja pada media yang sering digunakan

Media	Inkubasi	Organisme kontrol	Hasil yang diharapkan
Agar bile-aesculin	24 jam	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus α-hemolitik</i>	Tumbuh dan media menghitam Tidak tumbuh, ada hemolisis
Agar darah	24 jam, CO ₂	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i>	Tumbuh dan hemolisis β Tumbuh dan hemolisis α
Agar coklat	24 jam, CO ₂	<i>Haemophilus influenzae</i>	Tumbuh
Dekarboksilase (tutup dengan minyak steril)			
– lisin	48 jam	<i>Shigella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i>	Positif Negatif
– ornitin	48 jam	<i>S. typhimurium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positif Negatif
Dihidrolase			
– arginin	48 jam	<i>S. typhimurium</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Positif Negatif
Gelatinase (uji cepat)	24 jam	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	Negatif Positif
Kligler iron agar (lihat triple sugar iron agar)			
Agar MacConkey dengan kristal violet	24 jam	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. faecalis</i>	Koloni merah Koloni tak berwarna (tidak ada penjarangan/ swarming) Tidak tumbuh
Kaldu malonat	24 jam	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Negatif (hijau) Positif (biru)

Tabel 3. Uji kinerja pada media yang sering digunakan (lanjutan)

Media	Inkubasi	Organisme kontrol	Hasil yang diharapkan
Mannitol salt agar	24 jam	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Koloni kuning Koloni merah muda (rose) Tidak tumbuh
Methyl red/ Voges –Proskauer	48 jam	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Positif/ negatif Negatif/ positif
Agar Mueller-Hinton	24 jam	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ukuran zona yang dapat diterima (Tabel 24, hal. 103)
Kaldu nitrat	24 jam	<i>E. coli</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>	Positif Negatif
Oksidase/fermentasi dekstrose (tanpa minyak)	24 jam	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. lwoffii</i>	Oksidasi pada permukaan Tidak berubah
Air pepton (indol)	24 jam	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Positif Negatif
Fenilalanin deaminase/ ferri klorida	24 jam	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Negatif Positif
Agar Salmonella-Shigella atau agar deoksikolat sitrat	24 jam	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>S. flexneri</i>	Tidak tumbuh Koloni tak berwarna Koloni lak berwarna Koloni tak berwarna
Kaldu selenit	24 jam	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	Tumbuh setelah subkultur Tidak tumbuh setelah subkultur
Agar Simmons sitrat (inkubasi dengan tutup ulir yang longgar)	48 jam	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Tidak tumbuh Tumbuh, warna biru
Agar thiosulfate citrate bile salts	24 jam	<i>Vibrio</i> spp. (tidak beraglutinasi)	Koloni kuning
Agar Thayer-Martin	24 jam, CO ₂	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>E. coli</i> <i>C. albicans</i>	Tumbuh Tumbuh Tidak tumbuh Tidak tumbuh Tidak tumbuh
Kaldu thioglikolat	24 jam	<i>Bacteroides fragilis</i>	Tumbuh
Triple sugar iron agar (kedalaman pangkal harus sedikitnya 2,5 cm; inkubasi dengan tutup ulir longgar)	24 jam	<i>Citrobacter freundii</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i> <i>A. lwoffii</i>	A/A gas ^a + H ₂ S K/A gas ^a + H ₂ S K/A gas ^a Tidak ada perubahan
Media urea	24 jam	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Negatif Positif (merah muda)
Voges-Proskauer (lihat Methyl red/Voges-Proskauer)			

^aA/A: lereng asam; K/A: lereng basa

Prosedur yang harus diikuti bila menjalankan uji kinerja pada media berbatch baru adalah:

1. Siapkan suspensi galur stok dengan kekeruhan yang hampir tidak terlihat, setara dengan kekeruhan baku barium sulfat yang digunakan pada metode Kirby-Bauer yang telah dimodifikasi (McFarland 0,5) (lihat hal. 102) dan gunakan 1 sengkeliit sebagai inokulum.
2. Inkubasi selama waktu yang rutin digunakan. Baca plat seperti biasa.
3. Buatlah pencatatan hasil dengan baik.

Pewarnaan dan reagen

Rekomendasi untuk pengujian sejumlah reagen dapat dilihat pada Tabel 4. Pengujian harus dilaksanakan:

- setiap kali larutan kerja dengan *batch* baru tersedia;
- setiap minggu (ini sangat penting untuk pewarnaan Ziehl-Neelsen dingin: pewarnaan klasik mempunyai waktu simpan beberapa bulan).

Pewarnaan dan reagen harus dibuang jika:

- sudah sampai tanggal kadaluarsa dari pabrik;
- tampak tanda-tanda perburukan (kekeruhan, endapan, perubahan warna).

Tabel 4. Uji kinerja reagen yang sering digunakan

Reagen atau pewarnaan	Spesies yang sesuai untuk pengujian		Media
	Positif	Negatif	
Cakram basitrasin	<i>S. pyogenes</i> (zona)	<i>E. faecalis</i>	Agar darah
Katalase	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	Agar triptic soy
Plasma koagulase	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Agar triptic soy
β -glukuronidase (PGUA) ^a	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Agar triptic soy
Pewarnaan Gram	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	Tercampur dalam apusan
ONPG ^b	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	Triple sugar iron agar atau Kligler iron agar
Cakram optochin	<i>S. pneumoniae</i> (zona)	<i>Streptococcus mitis</i>	Agar darah
Oksidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Agar triptic soy
Cakram tellurit	<i>E. faecalis</i> (tidak ada zona)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (zona)	Agar darah
Faktor V (cakram atau carik)	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Agar triptic soy
Faktor XV (cakram atau carik)	<i>H. influenzae</i>		Agar triptic soy
Pewarnaan Ziehl-Neelsen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	flora campuran bukan tahan asam	apusan sputum ^c

^a4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosiduronic acid. (PGUA)

^bo- Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside.

^cSiapkan sejumlah apusan dari pasien yang diketahui positif dan negatif. Fiksasi dengan panas, bungkus satu demi satu dengan kertas, dan simpan dalam lemari pendingin.

Antigen dan antiserum diagnostik

Untuk mendapatkan hasil terbaik dari antigen dan antiserum:

- Ikutilah selalu petunjuk dari pabrik
- Simpanlah pada suhu yang dianjurkan. Beberapa reagen serologis tidak tahan terhadap suhu beku.
- Hindari pembekuan dan pencairan berulang. Sebelum membekukan, bagilah antiserum menjadi bagian-bagian yang cukup untuk beberapa pemeriksaan.
- Buang jika sudah sampai tanggal kadaluarsa dari pabrik.
- Untuk menguji antiserum yang menyebabkan aglutinasi, gunakan selalu biakan murni yang segar dengan reaktivitas yang diketahui.
- Sertakan selalu kontrol serum dengan reaktivitas yang diketahui pada tiap *batch* uji.
- Jika mungkin, potensi serum kontrol harus dinyatakan dalam Unit Internasional per mililiter.
- Serum berpasangan (*paired sera*) dari seorang pasien yang diambil selama fase akut dan penyembuhan (*convalescent*) penyakit, harus diuji dengan reagen dari *batch* yang sama.
- Untuk diagnosis serologis sifilis, sebaiknya hanya menggunakan prosedur yang diakui secara nasional atau internasional.
- Tiap *batch* uji serologis harus meliputi:
 - serum negatif (kendali spesifisitas)
 - serum yang reaktif lemah (kendali sensitivitas)
 - serum yang reaktif kuat (kendali titrasi), yang harus terbaca dalam rentang satu pengenceran dari titernya pada pengujian terakhir.
- Semua titer serum kontrol harus selalu dicatat.

Uji kepekaan antibiotika

Dianjurkan untuk menggunakan metode Kirby-Bauer yang telah dimodifikasi secara rutin (hal. 102). Untuk menghindari kesalahan, sebaiknya gunakan pedoman berikut ini:

- Cakram harus mempunyai diameter yang benar (6,35 mm).
- Cakram harus mempunyai potensi yang benar (Tabel 24, hal. 103).
- Suplai persediaan harus disimpan dalam keadaan beku (-20°C).
- Suplai kerja jangan disimpan lebih lama dari 1 bulan dalam lemari pendingin ($2-8^{\circ}\text{C}$).
- Hanya gunakan agar Mueller-Hinton dengan mutu yang telah teruji.
- pH yang sesuai (7,2–7,4) untuk media yang telah jadi sangat penting bagi beberapa antibiotika.
- Inokulum harus dibakukan terhadap baku kekeruhan yang telah ditetapkan (hal. 103).
- Ukuran zona harus diukur dengan tepat.
- Ukuran zona harus diinterpretasikan dengan merujuk pada tabel diameter kritis (*table of critical diameters*). Diameter zona bagi tiap organisme harus masuk dalam batasan yang diberikan pada Tabel 24 (hal. 103).
- Ketiga galur kontrol baku adalah:¹
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; NCTC 6571)
 - *Escherichia coli* (ATCC 25922; NCTC 10418)
 - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853; NCTC 10622)
- Pengujian harus dilakukan dengan ketiga galur baku:
 - pada saat menggunakan cakram dengan *batch* baru;
 - pada saat menggunakan media dengan *batch* baru;
 - sekali seminggu, sejalan dengan antibiogram rutin.
- Gunakan grafik pemantapan mutu yang ditunjukkan pada Gbr. 16 (hal. 113) untuk mencatat dan menilai uji kinerja.

¹Galur-galur ini dapat diperoleh dari: American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, AS; atau National Collection of Type Cultures (NCTC), PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, Inggris.

Pemeliharaan dan penggunaan stok biakan

Pemilihan dan asal

Pilih galur yang memungkinkan pengujian sifat-sifat morfologis, metabolik, dan serologis sebanyak-banyaknya dengan jumlah biakan sesedikit mungkin; daftar galur yang disarankan dapat dilihat pada Tabel 2. Galur-galur tersebut dapat diperoleh dari kombinasi sumber-sumber berikut ini:

- isolat dari spesimen klinis yang tercatat dengan baik;
- koleksi biakan yang resmi;
- produsen komersial;
- survei penilaian mutu eksternal;
- laboratorium rujukan.

Pengawetan

Pengawetan jangka panjang

Metode-metode pengawetan jangka panjang memungkinkan subkultur dilakukan setelah berbulan-bulan, bahkan bertahun-tahun. Metode terbaik adalah liofilisasi (pengeringan beku) atau penyimpanan pada suhu -70°C atau kurang, dalam lemari pembeku listrik, atau dalam nitrogen cair. Metode alternatif dipaparkan di bawah ini:

Gliserol pada -20°C

1. Tanamlah suatu biakan murni pada media padat yang sesuai.
2. Jika biakan sudah tumbuh sempurna, cungkil dengan sengkelit.
3. Suspensikan gumpalan kecil biakan tersebut dalam gliserol netral steril.
4. Bagi-bagikan dalam jumlah 1–2 ml dalam tabung atau vial bertutup ulir.
5. Simpan pada suhu -20°C . Hindari pembekuan dan pencairan berulang kali. Pindahkan setelah 12–18 bulan.

Minyak mineral pada suhu ruang¹

1. Siapkan tabung-tabung berisi *heart infusion agar* dengan lereng yang pendek. Untuk organisme yang sulit tumbuh (*fastidious*), tambahkan darah segar murni (*fresh native blood*) atau darah yang dipanaskan.
2. Sterilkan minyak mineral (*liquid petrolatum*) dalam udara panas (170°C selama 1 jam).
3. Tanam biakan murni pada lereng agar.
4. Jika sudah tampak pertumbuhan yang bagus, tambahkan minyak mineral steril sampai kira-kira 1 cm di atas ujung lereng.
5. Lakukan subkultur jika diperlukan dengan mencungkil biakan yang tumbuh di bawah minyak.
6. Simpan pada suhu ruang. Pindahkan setelah 6–12 bulan.

Biakan tusuk pada suhu ruang (gunakan untuk organisme yang tidak sulit tumbuh saja, misalnya *stafilokokus* dan *Enterobacteriaceae*)

1. Siapkan tabung-tabung berisi agar bebas karbohidrat dengan puntung (*butt*) yang dalam. Dianjurkan untuk menggunakan *triptic soy agar* (agar digesti kasein kacang kedelai).
2. Tusuk organisme ke dalam agar.
3. Inkubasi semalaman pada suhu 35°C .
4. Tutup tabung dengan tutup ulir atau gabus. Celupkan tutup atau gabus ke dalam lilin parafin cair untuk menyegelnya.
5. Simpan pada suhu ruang. Pindahkan setelah 1 tahun.

¹Morton HE, Pulaski EJ. The preservation of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 1938, 38:163-183.

Biakan tusuk dalam cystine tripticase agar (CTA) (untuk *Neisseria* dan streptokokus)

1. Siapkan tabung-tabung berisi media dasar CTA.
2. Tusukkan organisme ke dalam media.
3. Inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
4. Tutup tabung dengan tutup ulir atau gabus. Celupkan tutup atau gabus ke dalam lilin parafin cair untuk menyegelnya.
5. Untuk *Neisseria*, simpan pada suhu 35° C, dan pindahkan tiap 2 minggu. Untuk streptokokus, simpan pada suhu ruang, dan pindahkan setiap bulan.

Media daging-masak untuk anaerob

1. Inokulasikan kuman ke dalam tabung.
2. Inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
3. Tutup tabung dengan tutup ulir atau gabus.
4. Simpan pada suhu ruang. Pindahkan setiap 2 bulan.

Pengawetan jangka pendek

Biakan kerja untuk pengujian rutin harian dapat dibuat sebagai berikut:

Organisme yang tumbuh cepat

1. Inokulasikan pada lereng *tryptic soy agar* dalam tabung bertutup ulir.
2. Inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
3. Simpan dalam lemari pendingin. Pindahkan tiap 2 minggu.

Streptococcus

1. Inokulasikan pada lereng agar darah dalam tabung bertutup ulir.
2. Inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
3. Simpan dalam lemari pendingin. Pindahkan tiap 2 minggu.

Meningokokus* dan *Haemophilus

1. Inokulasikan pada lereng agar coklat atau plat agar coklat.
2. Inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
3. Simpan pada suhu ruang. Pindahkan dua kali seminggu.

Gonokokus

1. Inokulasikan pada agar coklat.
2. Inkubasi dan simpan pada suhu 35° C. Pindahkan setiap 2 hari.
3. Gantilah galur kendali mutu dengan tiap isolat klinis baru.

Penggunaan laboratorium rujukan

Golongan spesimen berikut ini harus dikirimkan ke laboratorium rujukan regional atau pusat:

- spesimen untuk uji yang jarang diminta atau sangat khusus (misalnya, virologi, serodiagnosis infeksi parasit);
- spesimen duplo, sebagai kontrol bagi hasil dari laboratorium pengirim;
- spesimen yang memerlukan konfirmasi lebih lanjut, spesifikasi, pengelompokan atau penentuan jenis patogen yang sangat penting terhadap kesehatan masyarakat (misalnya, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Brucella*, meningokokus, dan pneumokokus).

Laboratorium rujukan harus dapat menyediakan biakan rujukan untuk kepentingan pengendalian mutu dan pelatihan, serta serum dan reagen baku sebagai pembandingan dengan yang digunakan di laboratorium perujuk.

Jika tidak ada program penilaian mutu eksternal, laboratorium rujukan sebaiknya diminta untuk menyediakan spesimen dan biakan yang diberi kode tetapi tidak diketahui (*blind*) sehingga laboratorium perujuk dapat menguji kemampuannya sendiri dalam melakukan isolasi dan identifikasi.

Penilaian mutu eksternal

Bagian ini memberi petunjuk mengenai hal-hal yang diikutsertakan dalam suatu skema pemantapan mutu eksternal (kadang-kadang disebut “skema pengujian kemampuan”).

Tujuan

Tujuan suatu program penilaian mutu adalah:

- memberikan kepastian kepada dokter dan masyarakat umum bahwa diagnosis laboratorium bermutu baik;
- menilai dan membandingkan keandalan kinerja laboratorium dalam skala nasional;
- mengidentifikasi kesalahan-kesalahan umum;
- mendorong penggunaan prosedur yang seragam;
- mendorong penggunaan reagen baku;
- mengambil tindakan administratif (yang mungkin mencakup penarikan izin beroperasi) terhadap laboratorium yang tidak memenuhi standar;
- merangsang penerapan program pemantapan mutu internal.

Organisasi

Suatu program penilaian mutu terdiri dari sejumlah survei; pada survei tersebut, spesimen yang diberi kode dikirimkan ke laboratorium yang berpartisipasi melalui pos. Spesimen-spesimen tersebut harus disertakan dalam pemeriksaan rutin laboratorium, ditangani, serta diuji dengan cara yang sama persis dengan spesimen klinis rutin.

Survei harus dilakukan sesuai dengan anjuran berikut:

- survei harus dilakukan sedikitnya 4 kali setahun;
- sedikitnya harus disertakan 3 spesimen pada tiap survei;
- jangka pelaporan harus singkat, misalnya 2 minggu setelah penerimaan spesimen;
- petunjuk dan formulir pelaporan harus disertakan pada setiap survei dan lembar laporan harus ganda, dengan batas waktu yang tercantum dengan jelas.

Biakan

Biakan harus disertakan dalam identifikasi dan uji kepekaan terhadap serangkaian antibiotika tertentu; biakan dapat berupa biakan murni atau campuran 2 biakan atau lebih.

Biakan harus mewakili sedikitnya 3 kategori pertama dari 6 kategori berikut.

1. Spesies bakteri yang mempunyai potensi kesehatan masyarakat yang besar, tetapi tidak sering ditemui dalam praktek rutin, misalnya *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella paratyphi A*. CATATAN: *Brucella* dan *Salmonella typhi* tidak boleh digunakan untuk penilaian mutu karena dapat menimbulkan infeksi serius yang tidak disengaja.
2. Biotipe abnormal yang sering salah diidentifikasi, misalnya *Escherichia coli* yang menghasilkan H_2S (H_2S -positive), *E. coli* yang tidak memfermentasi laktosa (*lactose-negative*), *Proteus* dengan urease negatif.
3. Patogen yang baru dikenal atau patogen oportunistik, misalnya *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas cepacia*.
4. Campuran *Shigella*, *Citrobacter*, *E. coli*, dan *Klebsiella* dapat digunakan untuk menguji kemampuan laboratorium dalam mengisolasi mikroorganisme patogen dari sejumlah organisme komensal.

5. Campuran organisme non-patogen dapat digunakan untuk menguji kemampuan mengenali spesimen yang negatif.
6. Bakteri dengan pola resistensi khusus, misalnya *S. aureus* yang resisten terhadap meticillin (*meticillin-resistant S. aureus*/MRSA).

Serum

Uji serologis untuk infeksi-infeksi berikut harus menjadi bagian dalam program penilaian mutu dalam bidang bakteriologi:

- sifilis
- rubella
- brucellosis
- infeksi streptokokus
- demam tifoid

Penilaian dan pelaporan hasil

Begitu semua laporan hasil diterima dari laboratorium pengirim, jawaban yang benar harus dikirim ke laboratorium-laboratorium tersebut. Dalam waktu 1 bulan setelahnya, laporan akhir harus dikirimkan ke laboratorium-laboratorium tersebut dengan analisis hasil. Skor kinerja diberikan kepada setiap laboratorium. Setiap laboratorium harus mempunyai nomor kode yang hanya diketahui laboratorium itu sendiri. Dengan demikian, laboratorium tersebut dapat mengetahui kinerjanya dibandingkan dengan laboratorium lain, tetapi laboratorium lain tetap anonim.

BAGIAN I

Pemeriksaan bakteriologis

Darah

Pendahuluan

Darah dibiakkan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri atau mikroorganisme lain yang dapat dibiakkan (ragi, kapang). Keberadaan organisme-organisme tersebut dalam darah disebut bakteremia atau fungemia, dan biasanya bersifat patologis. Pada subjek sehat, darah bersifat steril. Walaupun demikian, terdapat beberapa pengecualian: bakteremia transien sering terjadi segera setelah pencabutan gigi atau manipulasi gigi lainnya atau manipulasi bedah pada membran mukosa yang terkontaminasi, bronkoskopi atau kateterisasi uretra. Jenis bakteremia transien ini biasanya disebabkan oleh bakteri komensal dan biasanya sembuh dengan sendirinya melalui fagositosis bakteri di hati dan limpa.

Septikemia adalah istilah klinis yang digunakan pada bakteremia dengan manifestasi klinis infeksi berat, yang meliputi menggigil, demam, malaise, toksisitas, dan hipotensi; bentuk ekstimnya berupa renjatan. Renjatan dapat disebabkan oleh toksin yang dihasilkan oleh batang Gram-negatif atau kokus Gram-positif.

Kapan dan di mana bakteremia dapat terjadi

Bakteremia adalah suatu gambaran pada beberapa penyakit infeksi, misalnya brucellosis, leptospirosis, dan demam tifoid. Bakteremia persisten adalah gambaran infeksi endovaskular, misalnya endokarditis, aneurisma terinfeksi, dan tromboflebitis.

Bakteremia transien sering menyertai infeksi lokal seperti artritis, *bedsores*, kolesistitis, enterokolitis, meningitis, osteomyelitis, peritonitis, pneumonia, pyelonefritis, dan infeksi luka traumatik atau bedah. Bakteremia transien dapat timbul dari berbagai manipulasi bedah, tetapi biasanya sembuh sendiri pada subjek yang sehat.

Bakteremia dan fungemia dapat disebabkan karena masuknya mikroorganisme secara iatrogenik melalui jalur intravena: melalui cairan intravena yang terkontaminasi, kateter, atau tempat tusukan jarum. Kedua jenis infeksi tersebut dapat terjadi pada pengguna obat intravena dan subjek dengan immunosupresi, mencakup pengidap virus imunodefisiensi manusia/sindrom imunodefisiensi akuisita (HIV/AIDS). Infeksi ini seringkali disebabkan oleh mikroorganisme "oportunistik" dan mungkin mempunyai konsekuensi yang serius. Tabel 5 menunjukkan penyebab tersering bakteremia atau fungemia.

Pengambilan darah

Waktu pengambilan darah

Sedapat mungkin, pengambilan darah dilakukan sebelum antibiotik diberikan. Waktu terbaik adalah pada saat pasien diperkirakan menggigil atau suhunya naik. Disarankan pengambilan dua atau lebih baik tiga biakan darah dengan selang waktu kira-kira 1 jam (atau kurang jika pengobatan tidak bisa ditunda). Jarang diindikasikan lebih dari tiga biakan darah. Keuntungan biakan berulang adalah:

- mengurangi kemungkinan terlewatnya suatu bakteremia transien;
- peran isolat "saprofit" (misalnya, *Staphylococcus epidermidis*) sebagai patogen dapat dipastikan bila organisme tersebut didapatkan dari beberapa kali pengambilan darah vena.

Spesimen darah untuk biakan harus diambil sebelum memulai terapi antimikroba empiris. Jika perlu, pemilihan antimikroba dapat disesuaikan setelah hasil uji kepekaan didapatkan.

Tabel 5. Penyebab bakteremia atau fungemia yang sering ditemukan

Organisme Gram-negatif	Organisme Gram-positif
<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>S. epidermidis</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Streptococcus α-haemolyticus</i> (viridans)
<i>Proteus</i> spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>E. faecalis</i> (grup D)
<i>Salmonella</i> spp. selain <i>S. typhi</i>	<i>S. pyogenes</i> (grup A)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i> (grup B)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> (anaerob)	<i>Peptostreptococcus</i> spp. (anaerob)
<i>Brucella</i> spp.	<i>Candida albicans</i> dan jamur mirip ragi lainnya
<i>Burkholderia</i> (<i>Pseudomonas</i>) <i>pseudomallei</i> (di daerah tertentu)	(misalnya, <i>Cryptococcus neoformans</i>)

Jumlah darah

Oleh karena jumlah bakteri per mililiter darah biasanya rendah, jumlah darah yang diambil harus cukup banyak: 10 ml tiap pungsi vena untuk orang dewasa; 2–5 ml mungkin mencukupi untuk anak, yang biasanya mempunyai tingkat bakteremia yang lebih tinggi; untuk bayi dan neonatus, 1–2 ml seringkali merupakan volume maksimal yang bisa diperoleh. Untuk tiap pungsi vena harus digunakan dua tabung: tabung pertama adalah tabung berventilasi untuk isolasi optimal mikroorganisme obligat aerob, tabung kedua yang kedap udara untuk biakan anaerob.

Desinfeksi kulit

Kulit pada tempat pungsi vena harus dipersiapkan dengan teliti menggunakan desinfektan bakterisidal: iodium tinktur 2%, polividon iodium 10%, alkohol 70%, atau klorheksidin 0,5% dalam alkohol 70%. Desinfektan harus dibiarkan menguap pada permukaan kulit sebelum darah diambil. Jika menggunakan iodium tinktur, harus dihapus dengan alkohol 70% untuk menghindari kemungkinan iritasi kulit.

Bahkan setelah kulit dipersiapkan dengan hati-hati, beberapa bakteri tetap ada dalam lapisan kulit yang lebih dalam dan dapat masuk ke dalam darah, misalnya, *S. epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, dan bahkan spora *Clostridium*. Pseudobakteremia (biakan darah positif palsu) dapat diakibatkan oleh penggunaan larutan antiseptik, spuit atau jarum yang tercemar. Isolasi suatu organisme yang tidak umum (misalnya, *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*, *Pantoea* (*Enterobacter*) *agglomerans*, atau *Serratia* spp.) secara berulang di rumah sakit yang sama harus menimbulkan kecurigaan akan suatu infeksi nosokomial dan mendorong diadakannya penyelidikan. Sumber pencemaran lainnya adalah kontak jarum dengan vial (atau larutan) yang tidak steril; jika spuit yang sama pertama kali digunakan untuk mengambil darah untuk pemeriksaan kimia atau pengukuran laju endap darah.

Antikoagulan

Penggunaan natrium polianetol sulfonat (SPS) sebagai antikoagulan dianjurkan karena SPS juga menghambat efek antibakteri serum dan fagosit. Jika darah langsung ditambahkan ke dalam kaldu dengan volume cukup (50 ml) dan dicampur dengan seksama untuk mencegah pembekuan, antikoagulan tidak diperlukan. Dianjurkan semua rumah sakit dan pusat kesehatan yang besar menyediakan botol biakan darah. Jika botol biakan darah tidak tersedia, darah dapat dibawa ke laboratorium dalam tabung yang mengandung larutan antikoagulan steril (sitrut, heparin, atau SPS). Begitu diterima di laboratorium, bahan darah yang demikian harus segera dipindahkan ke botol biakan darah menggunakan teknik aseptik yang ketat. Jika darah diambil tanpa antikoagulan, bekuan dapat dipindahkan secara aseptik ke dalam kaldu di laboratorium dan serumnya digunakan untuk uji serologis tertentu (misalnya, Widal).

Media biakan darah

Pemilihan media kaldu

Kaldu biakan darah dan *tryptic soy broth* (TSB) seharusnya mampu mendukung pertumbuhan semua bakteri yang penting secara klinis.

Jumlah kaldu

Idealnya, darah harus dicampur kaldu dengan volume 10 kali lipatnya (5 ml darah dalam 50 ml kaldu) untuk mengencerkan antibiotik yang ada dan mengurangi efek bakterisidal serum manusia.

Botol biakan darah

Harus digunakan botol biakan darah (125 ml) dengan tutup ulir yang telah dilubangi sebelumnya serta diafragma karet. Isilah botol dengan 50 ml media, lalu longgarkan tutup ulir setengah putaran. Tutuplah tutup botol dengan kertas aluminium berbentuk bujursangkar dan autoklaf botol tersebut selama 20 menit pada suhu 120°C. Segera setelah diautoklaf, selagi botol dan media masih panas, kencangkan tutupnya tanpa melepas kertas aluminium (jika tidak, tutupnya akan menjadi tidak steril). Saat media mendingin, akan tercipta kedap udara sebagian di dalam botol, yang akan memudahkan injeksi bahan darah melalui diafragma.

Bagian atas tutup harus didesinfeksi dengan cermat, tepat sebelum botol diinokulasi.

Sebelum distribusi dan sebelum dipakai, semua botol biakan darah harus diperiksa kejernihannya dengan cermat. Media yang keruh jangan digunakan.

Jika dicurigai adanya bakteri obligat aerob (*Pseudomonas*, *Neisseria*) atau sel ragi, botol harus diberi ventilasi segera setelah diterima di laboratorium, dengan memasukkan jarum yang disumbat kapas melalui diafragma yang telah didesinfeksi. Jarum dapat dicabut begitu tekanan dalam botol mencapai tekanan atmosfer. Botol biakan darah komersial sering kali juga mengandung karbon dioksida, yang mempunyai efek merangsang pertumbuhan.

Di negara-negara tempat brucellosis sering ditemukan, dianjurkan untuk menggunakan botol biakan darah bifasik dengan fase kaldu dan fase agar padat miring pada salah satu permukaan botol yang datar (botol Castaneda) untuk membiakkan *Brucella* spp. Keberadaan karbon dioksida diperlukan untuk isolasi sebagian besar galur *B. abortus*.

Pengerjaan biakan darah

Waktu inkubasi

Botol biakan darah harus diinkubasi pada suhu 35–37°C dan diperiksa secara rutin dua kali sehari (setidaknya 3 hari pertama) untuk melihat tanda-tanda pertumbuhan bakteri. Biakan yang steril biasanya menunjukkan selapis endapan eritrosit yang tertutup oleh kaldu kuning muda yang tembus pandang. Adanya pertumbuhan ditandai oleh:

- endapan flokular di atas lapisan darah,
- kekeruhan yang merata atau di bawah permukaan,
- hemolisis,
- penggumpalan kaldu,
- pelikel di permukaan,
- produksi gas,
- bulir-bulir putih pada permukaan atau dalam lapisan darah.

Jika tampak pertumbuhan yang kasat mata, botol harus dibuka secara aseptik, ambil sedikit kaldu dengan sengkeli steril atau pipet Pasteur, dan periksa sediaan hapus yang dipulas Gram untuk melihat adanya mikroorganisme.

Subkultur dilakukan dengan menggosok satu sengkeli penuh pertumbuhan pada media yang sesuai:

- untuk batang Gram negatif: agar MacConkey, *Kligler iron agar*, media motilitas-indol-urease (MIU), agar Simmons sitrat;
- untuk batang Gram negatif kecil: agar darah;
- untuk stafilokokus: agar darah, *mannitol salt agar*;
- untuk streptokokus: agar darah dengan cakram optochin, basitrasin, dan cakram tellurite, agar darah domba untuk uji CAMP, serta agar *bile-aesculin*.

Untuk pemeriksaan rutin, tidak perlu melakukan inkubasi biakan darah lebih dari 7 hari. Dalam beberapa kasus, inkubasi dapat diperpanjang 7 hari lagi, misalnya jika dicurigai terdapat *Brucella* atau organisme sulit tumbuh (*fastidious*) lainnya, pada kasus-kasus endokarditis, atau jika pasien telah mendapat antimikroba.

Subkultur buta (*blind subcultures*) dan pengerjaan akhir

Beberapa mikroorganisme dapat tumbuh tanpa menimbulkan kekeruhan atau perubahan kaldu yang kasat mata. Organisme lain, misalnya pneumokokus, cenderung mengalami autolisis dan sangat cepat mati. Oleh karena itu, beberapa laboratorium melakukan subkultur rutin pada agar coklat setelah inkubasi 18–24 jam. Subkultur buta dapat dilakukan pada akhir masa inkubasi 7 hari, dengan memindahkan beberapa tetes biakan darah yang telah dicampur rata (menggunakan pipet Pasteur steril) ke dalam tabung berisi kaldu thioglikolat, yang kemudian diinkubasi dan diobservasi selama 3 hari.

Antibiogram

Jika dicurigai adanya stafilokokus atau batang Gram negatif, waktu yang berharga dapat dipersingkat dengan melakukan antibiogram langsung yang tidak baku, menggunakan kaldu yang positif sebagai inokulum. Lidi kapas steril dicelupkan ke dalam kaldu yang keruh, cairan berlebih diperas, dan lidi kapas digunakan untuk menginokulasi media Mueller-Hinton sesuai dengan metode yang baku (lihat hal. 102). Pembacaan awal sering kali dapat dilakukan setelah inkubasi selama 6–8 jam. Pada 95% kasus, hasil yang diperoleh dengan cara ini sesuai dengan hasil dari uji yang telah baku.

Pencemar

Pencemaran biakan darah dapat dihindari dengan persiapan kulit yang cermat dan mengikuti prosedur aseptik secara ketat untuk inokulasi dan subinokulasi. Walaupun demikian, bahkan dalam kondisi ideal sekalipun, pada 3–5% biakan darah, tumbuh “pencemar” yang berasal dari kulit (*S. epidermidis*, *P. acnes*, *Clostridium* spp., difteroid) atau dari lingkungan (*Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp.). Meskipun begitu, organisme demikian dapat sesekali bertindak sebagai patogen dan bahkan menyebabkan endokarditis. Infeksi yang sesungguhnya harus dicurigai pada keadaan-keadaan berikut ini:

- jika organisme yang sama tumbuh dalam dua botol spesimen darah yang sama;
- jika organisme yang sama tumbuh pada biakan yang berasal dari lebih dari satu spesimen;
- jika pertumbuhannya cepat (dalam 48 jam);
- jika isolat yang berbeda dari satu spesies menunjukkan biotipe dan profil kepekaan antimikroba yang sama.

Semua hasil biakan harus dilaporkan kepada klinisi, termasuk pencemar yang terduga. Walaupun demikian, tersangka pencemar tidak perlu dilakukan antibiogram, dan keterangan yang sesuai harus dibuat pada lembar laporan, misal *Propionibacterium acnes* (komensal kulit), *Staphylococcus epidermidis* (kemungkinan pencemar). Untuk kepentingan semua pihak terkait, perlu dibina komunikasi yang baik antara dokter dan petugas laboratorium.

Identifikasi dua atau lebih organisme dapat menunjukkan suatu bakteremia polimikrobia yang dapat ditemukan pada pasien yang lemah (*debilitated*), tetapi dapat pula disebabkan oleh pencemar. Bakteremia “anaerob” sering disebabkan oleh patogen multipel; misalnya, satu atau lebih kuman anaerob dapat disertai satu atau lebih kuman aerob pada bakteremia fulminan berat yang menyertai trauma berat atau pembedahan yang melibatkan usus besar.

Cairan serebrospinal

Pendahuluan

Pemeriksaan cairan serebrospinal (CSF) adalah langkah yang esensial dalam diagnosis meningitis bakterial dan fungal, dan CSF harus selalu dianggap sebagai spesimen prioritas yang perlu perhatian segera dari petugas laboratorium.

CSF normal bersifat steril dan jernih, dan biasanya mengandung tiga leukosit per mm³ atau kurang dan tidak mengandung eritrosit. Komposisi kimiawi dan sitologis CSF berubah pada peradangan selaput otak atau otak, yaitu pada meningitis atau ensefalitis. Yang akan dibahas di sini hanyalah pemeriksaan mikrobiologik CSF, walaupun jumlah leukosit dalam CSF juga merupakan hal yang sangat penting.

Agen penyebab meningitis tersering dicantumkan dalam Tabel 6 berdasarkan usia pasien, tetapi harus diingat bahwa terdapat tumpang tindih antar kelompok.

Pengambilan dan transpor spesimen

Kira-kira 5–10 ml CSF harus ditampung dalam dua tabung steril melalui pungsi lumbal atau pungsi ventrikel yang dilakukan oleh dokter. Mengingat bahaya meningitis bakterial iatrogenik, desinfeksi kulit secara teliti adalah suatu keharusan. Sebagian spesimen CSF akan digunakan untuk pemeriksaan sitologis dan kimia, dan sisanya untuk pemeriksaan mikrobiologis. Spesimen harus segera dikirim ke laboratorium, dan diproses secepatnya, karena sel mengalami disintegrasi dengan cepat. Keterlambatan dapat menyebabkan hasil hitung sel yang tidak sesuai dengan kondisi klinis pasien.

Pemeriksaan makroskopik

Tampilan CSF harus diperhatikan dan dicatat sebagai: jernih, agak keruh, keruh, purulen, kuning (karena hemolisis atau ikterus), atau kemerahan (*blood-tinged*), dengan jaring-jaring fibrin atau pelikel.

Tabel 6. Penyebab tersering meningitis bakterial dan fungal

Pada neonatus (sejak lahir sampai usia 2 bulan)

Escherichia coli

Listeria monocytogenes

Enterobacteriaceae lain: *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp.

Streptococcus agalactiae (grup B)

Pada kelompok usia lain

Haemophilus influenzae (tipe b kapsular)^a

Neisseria meningitidis

Streptococcus pneumoniae

Mycobacterium tuberculosis

Listeria monocytogenes^b

Cryptococcus neoformans^b

Stafilokokus^c

^a Jarang setelah usia 5 tahun.

^b Pada pasien-pasien tanggap imun lemah (termasuk mereka dengan sindrom imunodefisiensi manusia (AIDS)).

^c Berhubungan dengan bedah saraf dan *drain* pasca operasi.

Pemeriksaan mikroskopik

Persiapan spesimen

Jika pada pemeriksaan makroskopik CSF tampak purulen (sangat keruh), CSF dapat langsung diperiksa tanpa sentrifugasi. Pada semua kasus non-purulen, CSF harus disentrifugasi dalam tabung steril (lebih disukai dalam tabung kerucut 15 ml dengan tutup ulir) pada 10000 g selama 5–10 menit. Buang supernatan dengan menggunakan pipet Pasteur steril yang terpasang karet pengisap, dan pindahkan ke tabung lain untuk pemeriksaan kimia dan/atau serologis. Gunakan sedimen untuk pemeriksaan mikrobiologis lanjutan.

Pemeriksaan mikroskopik langsung

letakkan setetes sedimen pada kaca objek, tutup dengan kaca penutup dan periksalah di bawah mikroskop ($\times 400$) untuk mencari:

- leukosit (neutrofil polimorfonuklear atau limfosit)
- eritrosit
- bakteri
- ragi

Jika dicurigai adanya *Cryptococcus neoformans*, suatu jamur mirip ragi, campur satu sengkeli penuh sedimen dengan satu sengkeli penuh tinta India pada kaca objek, tutup dengan kaca tutup, dan periksalah dengan mikroskop untuk mencari bentuk-bentuk ragi yang khas, berkapsul, bulat, dan bertunas (*budding*).

Di daerah-daerah tempat ditemukannya tripanosomiasis Afrika, perlu dicari tripanosoma yang berflagel dan aktif bergerak secara seksama.

Jenis meningitis langka dan umumnya mematikan disebabkan oleh amuba yang hidup bebas dan ditemukan di air (*Naegleria fowleri*), yang masuk melalui hidung dan menembus sistem saraf pusat. Amuba ini dapat dilihat dalam preparat basah langsung sebagai amuba yang aktif bergerak kira-kira berukuran sebesar neutrofil.

Sediaan hapus yang dipulas Gram

Karena agen penyebab meningitis bakterial sering kali dapat ditemukan dalam hapusan yang dipulas Gram, pemeriksaan ini menjadi teramat penting. Hapusan dikeringkan di udara, difiksasi dengan api kecil, dan dipulas dengan metode Gram. Periksa dengan pembesaran $1000 \times$ (minyak emersi) selama sedikitnya 10 menit, atau sampai ditemukannya bakteri. Tabel 7 menunjukkan temuan diagnostik penting yang terkait dengan berbagai bentuk meningitis.

Pewarnaan tahan asam (Ziehl-Neelsen)

Walaupun sensitivitasnya tidak tinggi, pemeriksaan sediaan sedimen atau jaring-jaring fibrin dengan pewarnaan tahan asam diindikasikan pada kecurigaan meningitis tuberkulosis. Periksalah dengan teliti sediaan yang diwarnai dengan pewarnaan tahan asam selama sedikitnya 15 menit. Jika hasilnya negatif, pemeriksaan mikroskopik harus diulang dengan spesimen segar keesokan harinya.

Biakan

Jika bakteri telah terlihat dalam hapusan yang dipulas Gram, media biakan yang sesuai harus diinokulasi (Tabel 8). Jika tidak ditemukan organisme, lebih baik dilakukan inokulasi pada seluruh rangkaian media, termasuk agar darah dengan guratan *Staphylococcus aureus* untuk mendukung pertumbuhan *H. influenzae*. Lempeng agar darah dan agar coklat harus diinkubasi pada 35°C dalam udara yang diperkaya dengan karbon dioksida. Semua media harus diinkubasi selama 3 hari, dan diperiksa setiap hari.

Jika dicurigai meningitis tuberkulosis, sedikitnya 3 tabung media Löwenstein-Jensen harus diinokulasi dengan setetes sedimen dan diinkubasi selama 6 minggu. Selama 2–3 hari pertama, tabung harus diinkubasi pada posisi horisontal dengan tutup ulir yang dilonggarkan setengah putaran. Tabung harus diinspeksi seminggu sekali untuk melihat adanya pertumbuhan. Pertumbuhan-pertumbuhan yang mencurigakan harus dibuat hapusannya, lebih baik dalam *bacteriological safety cabinet*, dikeringkan di udara, difiksasi dengan api dan diwarnai dengan metode Ziehl-Neelsen. Adanya batang tahan asam sesuai dengan diagnosis tuberkulosis. Semua isolat harus dikirim ke laboratorium pusat untuk konfirmasi dan uji kepekaan.

Jika dicurigai *Cryptococcus neoformans*, baik dari sediaan tinta India atau berdasarkan temuan klinis, sedimen harus diinokulasi pada dua tabung agar Sabouraud dekstrosa dan diinkubasi pada suhu 35°C sampai selama 1 bulan. *C. neoformans* juga tumbuh pada lempeng agar darah, yang harus diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 minggu jika diindikasikan.

Tabel 7. Temuan cairan serebrospinal yang terkait dengan meningitis

Observasi	Jenis meningitis			
	Bakterial	Tuberkulosis	Fungal	Viral (aseptik)
Jumlah leukosit meningkat	Neutrofil polimorfonuklear segmen	Mononuklear (neutrofil muda)	Mononuklear	Mononuklear
Glukosa	Sangat rendah: 0,28–1,1 mmol/l	Rendah: 1,1–2,2 mmol/l	Rendah: 1,1–2,2 mmol/l	Normal: 3,6–3,9 mmol/l
Protein	Meningkat	Meningkat	Meningkat	Sedikit meningkat pada stadium awal infeksi
Sediaan hapus yang dipulas	Biasanya ditemukan bakteri (Gram)	Jarang positif (lahan asam)	Biasanya positif (tinta India)	Negatif

Tabel 8. Pilihan media biakan untuk spesimen CSF menurut hasil hapusan Gram^a

Observasi	Batang Gram negatif		Kokus Gram positif		Kokus Gram negatif	Batang Gram positif	Tidak ditemukan organisme
	Pada neonatus	Pada usia lain	Pada neonatus	Pada usia lain			
Agar darah ^b	+	+	+	+ dengan cakram optochin	+	+	+
Agar darah dengan guratan <i>S. aureus</i> ^b	+	+					+
Agar coklat		(+)			(+)		(+)
Agar MacConkey	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tryptic soy broth</i>	+	+	+	+	+	+	+

^a + = Gunakan; (+) = bisa digunakan bisa tidak (*optional*)

^b Inkubasi dalam udara yang kaya CO₂ (*candle jar* botol lilin)

Identifikasi awal

Pertumbuhan pada agar MacConkey menunjukkan kemungkinan Enterobacteriaceae dan harus diidentifikasi lebih lanjut menggunakan metode dan media yang dianjurkan untuk patogen enterik.

Koloni kokus Gram positif dengan daerah hemolisis- β yang tipis mungkin adalah *S. agalactiae* (streptokokus Grup B). Ini harus dipastikan dengan uji CAMP terbalik (hal. 94).

Koloni datar dengan bagian tengah yang cekung dan zona hijau tipis hemolisis- α kemungkinan adalah *S. pneumoniae*. Untuk konfirmasi, tempatkan cakram optochin berukuran 6 mm pada plat agar darah yang diinokulasi dengan biakan mumi galur yang dicurigai dalam jumlah yang banyak. Setelah inkubasi semalam, pneumokokus akan menunjukkan zona inhibisi berdiameter 14 mm atau lebih di sekeliling cakram optochin. Hasil terbaik didapatkan setelah inkubasi pada agar darah domba dalam udara yang diperkaya karbon dioksida. Jika pembacaan uji pada agar darah ini tidak dapat disimpulkan, uji hams diulang pada suatu subkultur.

Koloni *H. influenzae* hanya tumbuh pada agar coklat dan sebagai koloni satelit di sekitar guratan stafilokokus pada agar darah. Identifikasi lebih lanjut dapat dilakukan menggunakan antiserum *H. influenzae* tipe b pada uji aglutinasi kaca objek (*slide agglutination test*).

Diplokokus Gram-negatif yang tumbuh pada agar darah dan agar coklat dan memberikan hasil oksidase positif cepat dapat dianggap sebagai meningokokus. Konfirmasi dilakukan dengan mengelompokkannya dengan antiserum *N. meningitidis* yang sesuai (A, B, C) pada uji aglutinasi dengan kaca obyek. Uji aglutinasi yang negatif tidak menyingkirkan meningokokus karena sedikitnya ada empat serogrup lain. Jika uji aglutinasi negatif, harus dilakukan uji penggunaan karbohidrat, dan biakan tersebut harus dikirim ke laboratorium rujukan. Laporan pengantar harus diberikan kepada dokter pada setiap tahapan identifikasi (pulasan Gram, pertumbuhan, aglutinasi, dll), dengan catatan bahwa laporan akhir akan menyusul.

Koloni batang Gram-positif dengan zona hemolisis- β yang tipis pada agar darah kemungkinan adalah *Listeria monocytogenes*. Uji konfirmasi menunjukkan: reaksi katalase positif, motilitas pada biakan kaldu atau MIU, pertumbuhan dan perubahan warna menjadi hitam pada agar *bile-aesculin*.

Uji kepekaan

Untuk batang Gram-negatif dan stafilokokus, sebaiknya digunakan metode difusi cakram yang baku (Kirby-Bauer).

Tidak perlu melakukan uji kepekaan untuk *Listeria monocytogenes*, *S. agalactiae*, atau *N. meningitidis* karena resistensinya terhadap ampisilin dan bensilpenisilin amat sangat jarang.

Semua galur pneumokokus harus diuji kepekaannya terhadap kloramfenikol dan bensilpenisilin pada agar darah. Untuk uji kepekaan terhadap bensilpenisilin, disarankan menggunakan cakram oksasilin (1 μ g) (lihat hal. 62, "Infeksi saluran napas bawah").

Galur-galur *H. influenzae* harus diuji kepekaannya terhadap kloramfenikol menggunakan agar coklat atau agar darah yang diberi suplemen. Sebagian besar galur yang resisten ampisilin menghasilkan β -laktamase yang dapat ditunjukkan dengan salah satu uji cepat yang disarankan untuk penapisan galur gonokokus yang berpotensi menghasilkan β -laktamase (hal. 74).

Urine

Pendahuluan

Urine adalah spesimen yang paling sering dikirim untuk biakan. Urine juga menimbulkan masalah besar dalam hal pengumpulan spesimen yang baik, pengiriman, teknik biakan serta interpretasi hasil. Seperti juga spesimen lain yang dikirim ke laboratorium, makin komprehensif informasi yang diberikan oleh dokter pengirim, makin mampu laboratorium memberikan data biakan terbaik yang dimungkinkan.

Tempat-tempat tersering terjadinya infeksi saluran kemih (ISK) adalah kandung kemih (sistitis) dan uretra. Dari tempat-tempat tersebut, infeksi dapat naik ke ureter (ureteritis) dan kemudian mengenai ginjal (pielonefritis). Wanita lebih rentan terhadap infeksi saluran kemih dibandingkan pria dan juga lebih bermasalah dalam pengumpulan spesimen yang benar.

Baik pada pria maupun wanita, ISK dapat tanpa gejala, akut, atau kronik. Infeksi asimtomatik dapat didiagnosis dengan biakan. ISK akut lebih sering ditemukan pada wanita dari segala usia; pasien-pasien ini biasanya berobat jalan dan jarang dirawat inap. ISK kronik pada pria dan wanita di segala usia biasanya menyertai suatu penyakit dasar (misalnya, pielonefritis, penyakit prostat, atau kelainan kongenital saluran kemih dan kelamin) dan pasien-pasien ini umumnya dirawat inap. ISK asimtomatik, akut dan kronik adalah tiga entitas yang berbeda dan hasil pemeriksaan laboratorium ketiganya sering memerlukan interpretasi yang berbeda.

Pielonefritis asimtomatik pada wanita dapat tidak terdeteksi selama beberapa waktu, dan seringkali hanya terdiagnosis melalui biakan urine kuantitatif yang dikerjakan dengan hati-hati. Prostatitis kronik sering ditemukan dan sulit diobati, serta sering menyebabkan ISK berulang. Pada sebagian besar ISK, tanpa memandang jenisnya, bakteri enterik merupakan agen penyebab; *Escherichia coli* diisolasi jauh lebih sering daripada organisme lain. Pada sekitar 10% pasien dengan ISK, mungkin terdapat dua jenis organisme dan keduanya mungkin berkontribusi terhadap proses penyakit. Adanya tiga atau lebih organisme yang berbeda dalam biakan urin merupakan bukti dugaan kuat tidak benarnya pengumpulan atau penanganan spesimen urin. Walaupun demikian, organisme multipel sering ditemukan pada pasien dengan penggunaan kateter urine yang lama.

Pengambilan bahan

Pentingnya cara pengumpulan spesimen urin, pengirimannya ke laboratorium, dan upaya awal laboratorium untuk menapis dan membiakkan urine janganlah ditekankan secara berlebihan. Laboratorium bertanggung jawab untuk menyediakan dokter botol kaca atau plastik, yang steril dan bermulut lebar, gelas kimia, atau wadah penampung lain. Penampung ini harus mempunyai tutup yang rapat atau ditutup dengan kertas aluminium sebelum disterilkan dengan udara panas atau autoklaf.

Spesimen urine mungkin harus diambil dengan prosedur bedah, misalnya aspirasi suprapubik, sistoskopi, atau kateterisasi. Jika tidak, laboratorium harus berpegang pada spesimen urin porsi tengah (*clean-catch midstream urine*), khususnya pada wanita dan anak. Oleh karena urine itu sendiri merupakan media biakan yang baik, semua spesimen harus diproses di laboratorium dalam waktu 2 jam setelah pengumpulan, atau disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C sampai dibawa ke laboratorium dan diproses tidak lebih dari 18 jam setelah pengumpulan.

Sedapat mungkin, spesimen urine untuk biakan harus dikumpulkan pada pagi hari. Sebaiknya pasien diminta untuk menahan kencing semalam sebelumnya sampai spesimen dikumpulkan.

Pasien rawat jalan wanita harus:

1. Mencuci tangannya secara seksama dengan sabun dan air, lalu mengeringkannya dengan handuk bersih.
2. Melebarkan labia dan membersihkan vulva serta labia secara seksama menggunakan kapas dan air sabun yang hangat; lap dari depan ke belakang. Jangan gunakan desinfektan.
3. Membilas vulva dan labia secara seksama dengan air hangat dan mengeringkannya dengan kasa steril. Selama keseluruhan proses, pasien harus mempertahankan labia terbuka dan tidak boleh menyentuh daerah yang telah dibersihkan dengan jari.
4. Membuang urinenya sedikit. Pasien harus mengumpulkan sebagian besar urin yang tersisa dalam penampung steril, menutup wadahnya segera setelah urine terkumpul. Ini adalah spesimen urine porsi tengah.
5. Menyerahkan wadah yang tertutup kepada perawat untuk dikirimkan segera ke laboratorium.

Pasien rawat jalan pria harus:

1. Mencuci tangannya secara seksama dengan sabun dan air, dan mengeringkannya dengan handuk bersih.
2. Menarik kulit kulup (jika tidak disunat) dan mencuci glans dengan teliti menggunakan kapas steril dan air sabun hangat. Jangan gunakan desinfektan.
3. Membilas glans secara teliti dengan air hangat dan mengeringkannya dengan kasa steril. Selama keseluruhan proses, pasien tidak boleh menyentuh daerah yang telah dibersihkan dengan jari.
4. Menarik kulit kulup dan membuang urin sedikit. Sambil masih menarik kulit kulup, pasien harus membuang sebagian besar urin yang tersisa ke dalam penampung steril, menutup wadahnya segera setelah urine terkumpul. Ini adalah spesimen urine porsi tengah.
5. Menyerahkan wadah yang tertutup kepada perawat untuk dikirimkan segera ke laboratorium.

Untuk pasien-pasien yang terbaring di ranjang, ikuti prosedur yang sama, tetapi perawat harus membantu pasien. Jika perlu, lakukan seluruh prosedur membersihkan sebelum meminta pasien membuang urine.

Pada kedua keadaan tersebut, upayakan untuk mengumpulkan urine porsi tengah yang bersih dalam wadah steril dan pastikan urine segera dikirim ke laboratorium bersama keterangan mengenai pasien, diagnosis klinis, dan prosedur yang diminta.

Bayi dan anak

Pengumpulan spesimen urine bersih dari bayi dan anak yang terbaring sakit atau tidak kooperatif dapat menjadi masalah. Berilah anak air atau cairan lain untuk diminum. Bersihkan genitalia eksternal. Anak dapat didudukkan di pangkuan ibu, perawat atau petugas bangsal, yang kemudian meminta anak untuk buang air kecil dan mengumpulkan urine sebanyak mungkin dalam penampung steril. Penampung tersebut harus ditutup dan dikirim ke laboratorium untuk dikerjakan segera.

Biakan dan interpretasi

Semua spesimen urine yang dibawa ke laboratorium mikrobiologi harus diperiksa segera, atau disimpan di lemari pendingin pada suhu 4°C sampai saat diperiksa. Prosedur pemeriksaan meliputi langkah-langkah berikut:

1. Pemeriksaan sediaan haps yang dipulas Gram.
2. Uji penapisan untuk bakteriuria yang signifikan.
3. Biakan definitif bagi spesimen urine yang didapatkan positif pada uji penapisan, dan bagi seluruh spesimen yang diambil dengan cara sistoskopi, pungsi kandung kemih suprapubik (PKS), atau kateterisasi.
4. Uji kepekaan pada isolat bakteri yang bermakna secara klinis.

Pembuatan dan pemeriksaan sediaan hapus yang dipulas Gram adalah bagian yang penting dalam proses laboratorium. Dengan menggunakan pipet Pasteur steril (satu untuk tiap sampel), teteskan satu tetes urine yang telah tercampur baik dan belum disentrifus pada kaca objek. Biarkan tetesan tersebut mengering tanpa dibiarkan, fiksasi dengan api, dan warnai. Periksa di bawah lensa dengan minyak emersi ($\times 600$ atau lebih) untuk mencari ada tidaknya bakteri, leukosit polimorfonuklear, dan sel epitel gepeng.

Satu atau lebih bakteri per lapang pandang emersi biasanya menunjukkan adanya 10^5 atau lebih bakteri per mililiter dalam spesimen tersebut. Adanya satu atau lebih leukosit per lapang pandang emersi adalah petunjuk lebih lanjut adanya ISK. Sampel urin yang tidak terinfeksi biasanya menunjukkan sedikit atau tidak adanya bakteri atau leukosit dalam keseluruhan sediaan. Pada spesimen yang berasal dari wanita, keberadaan sel epitel gepeng dalam jumlah banyak, dengan atau tanpa campuran bakteri, merupakan petunjuk persumtif kuat spesimen tercemar flora vagina dan diperlukan pengumpulan spesimen ulang, tanpa memandang jumlah bakteri per lapang pandang emersi. Jika hasil diperlukan segera, pelaporan temuan sediaan Gram harus dikirim ke dokter dengan catatan yang menyatakan hasil biakan menyusul.

Metode penapisan/skrining

Tidak adanya leukosit dalam sediaan hapus pulasan Gram sampel urine bersih yang dibuat seperti di atas merupakan bukti yang baik bahwa urine tidak terinfeksi. Spesimen urine yang "negatif" pada pemeriksaan sediaan Gram yang teliti tidak perlu dibiakkan. Uji penapisan lain yang sederhana dan efektif adalah carik uji (*test strip*) untuk memeriksa esterase leukosit/reduksi nitrat. Carik tersebut dicelupkan ke dalam spesimen urine sesuai petunjuk dalam kemasan. Warna merah muda menandakan reaksi positif dan menunjukkan adanya esterase leukosit dan/atau bakteri lebih dari 10^5 per ml. Sampel urine yang positif pada uji penapisan harus dibiakkan sesegera mungkin untuk mencegah kemungkinan pertumbuhan berlebihan bakteri yang non-signifikan. Jika carik celup tidak berubah menjadi merah muda, uji penapisan diinterpretasikan negatif, dilaporkan demikian, dan biakan tidak diindikasikan. Carik celup mungkin kurang sensitif untuk mendeteksi bakteri berjumlah kurang dari 10^5 per ml urine.

Biakan kuantitatif dan identifikasi presumtif

Dua teknik untuk biakan kuantitatif dan identifikasi presumtif yang disarankan di sini: teknik sengkeli terkalibrasi (*calibrated loop*) dan metode carik celup kertas saring.

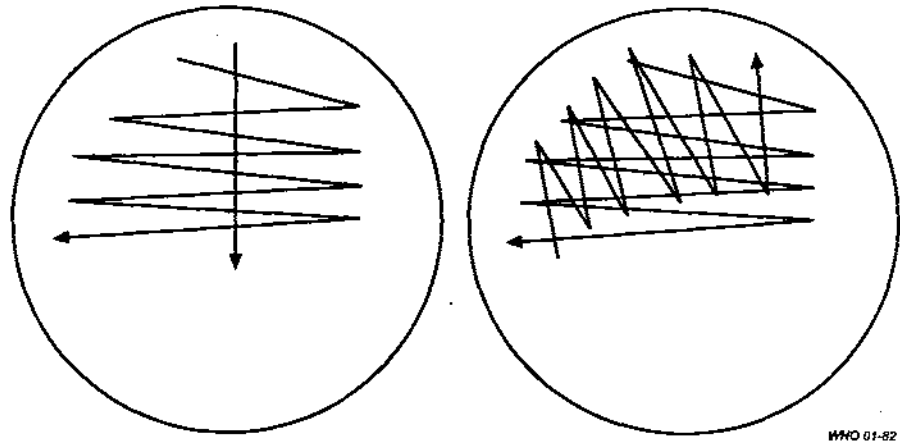
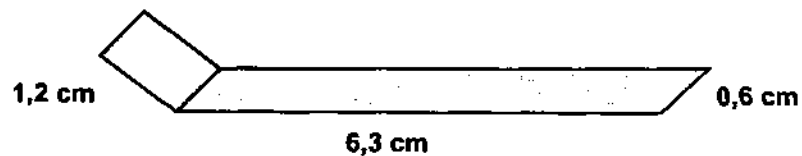
Teknik sengkeli terkalibrasi

Prosedur yang disarankan menggunakan sengkeli plastik atau logam yang telah terkalibrasi untuk memindahkan 1 μ l urine ke media biakan (agar MacConkey dengan kristal violet dan agar darah non-selektif).

1. Kocok urine perlahan, kemudian miringkan hingga membentuk lereng dan sentuh permukaannya dengan sengkeli 1 μ l penginokulasi sehingga urine tersedot ke dalam sengkeli. Jangan pernah mencelup sengkeli ke dalam urine.
2. Letakkan 1 μ l urine tersebut pada lempeng agar darah dan buat guratan membelah lempeng dengan membentuk garis lurus di tengah (1), diikuti dengan guratan-guratan rapat yang tegak lurus garis pertama (2), dan diakhiri dengan guratan-guratan miring yang memotong kedua kelompok guratan sebelumnya (3) (Gbr. 3).
3. Inokulasi agar MacConkey dengan cara yang sama.
4. Inkubasi lempeng tersebut semalaman pada suhu 35°C .

Agar darah dan agar macConkey juga dapat diganti dengan media non-selektif lainnya (misalnya, agar CLED¹, agar laktosa ungu).

¹CLED: Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient.

Gambar 3. Inokulasi bakteri pada lempeng biakan**Gambar 4. Diagram carik celup**

WHO 91125

Metode carik-celup kertas-saring

Metode carik-celup kertas-saring Leigh & Williams¹ didasarkan pada absorpsi dan pemindahan sejumlah tertentu urine ke media agar lempeng yang sesuai.

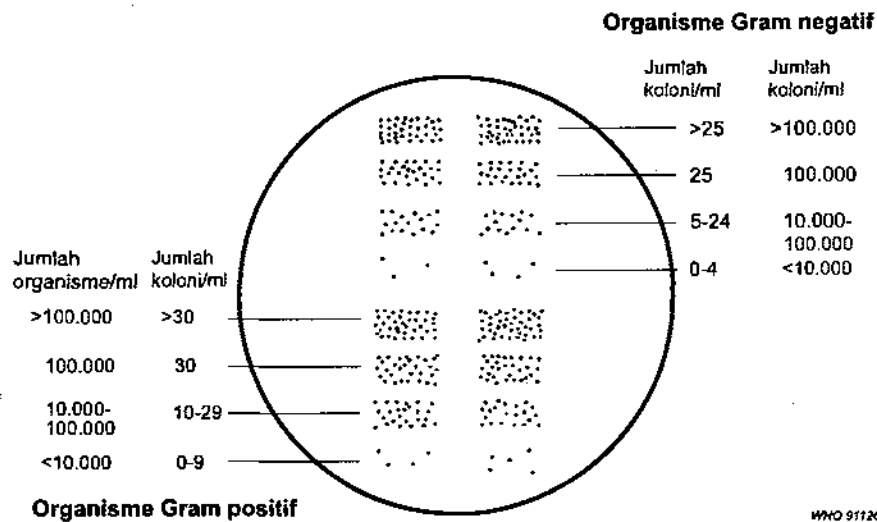
Carik celup dapat dibuat sendiri dengan menggunakan jenis kertas saring tertentu dan harus berukuran panjang 7,5 cm dan lebar 0,6 cm (lihat Gbr. 4). Kertas tersebut diberi tanda dengan pensil 1,2 cm dari salah satu ujungnya. Teknik carik celup kertas saring ini harus dibandingkan dengan teknik sengkeli terkalibrasi sebelum digunakan dalam pemeriksaan rutin. Carik celup dibuat dalam jumlah tertentu, diletakkan dalam wadah yang sesuai, dan diautoklaf. Carik celup steril tersedia di pasaran. Keluarkan satu carik celup steril dari wadahnya untuk setiap sampel urine yang akan diperiksa. Ujung yang ditandai dicelupkan sejauh tandanya ke dalam sampel urine yang sudah tercampur rata. Carik celup kemudian ditarik segera dan urine yang berlebih dibiarkan terserap.

Daerah di bawah garis, yang akan melipat seperti kaki huruf "L", kemudian ditempelkan pada lempeng agar brolacin² atau agar laktosa ungu selama 2–3 detik. Beberapa carik celup dapat dibiakkan pada satu lempeng dengan membagi permukaan bawah lempeng menjadi 16 persegi panjang (Gbr.5). Pastikan untuk mengidentifikasi tiap persegi panjang dengan nomor atau nama pasien. Keluarkan carik celup kedua dari wadahnya dan ulangi prosedur tersebut; buatlah cetakan kedua yang identik dengan yang pertama. Segera setelah lempeng tersebut selesai diinokulasi dengan cetakan rangkap dua (duplo), lempeng harus diinkubasi pada suhu 35–37°C, dan koloni yang dihasilkan dari tiap

¹ Leigh DA & Williams JD. Method for the detection of significant bacteriuria in large groups of patients. *Journal of Clinical Pathology*, 1964, 17: 498-503.

²Bromothymol-blue lactose cysteine agar

Gambar 5. Cetakan carik celup pada lempeng agar, yang menunjukkan konversi dari jumlah koloni menjadi jumlah bakteri per ml.



WHO 91126

cetakan carik celup dihitung. Dengan bantuan Gbr. 5 dimungkinkan untuk mengonversi jumlah koloni rata-rata setiap pasang carik celup menjadi jumlah bakteri per ml urine.

Segera setelah melakukan prosedur tersebut, inokulasikan spesimen urine pada separuh lempeng agar MacConkey (dengan kristal violet) menggunakan sengkeli steril. Penggunaan agar darah akan mempermudah identifikasi cepat kokus Gram-positif. Lempeng harus diinkubasi semalaman pada suhu 35–37°C, dan diperiksa keesokan harinya untuk melihat adanya pertumbuhan. Prosedur identifikasi kemudian dapat dimulai menggunakan koloni terpisah yang tampak sama. Jika diperlukan, inokulum untuk melakukan uji kepekaan difusi cakram (hal. 90) dapat dibuat dari salah satu lempeng tersebut. Dengan demikian, hasil uji identifikasi dan uji kepekaan bisa didapatkan pada hari berikutnya.

Interpretasi hasil biakan urine kuantitatif

Selama bertahun-tahun, keberadaan sedikitnya 10^5 satuan pembentuk koloni (*colony-forming unit*/CFU) per ml dalam spesimen urine porsi tengah yang bersih adalah satu-satunya yang dianggap relevan secara klinis untuk diagnosis infeksi saluran kemih. Asumsi ini mulai dipertanyakan; beberapa ahli meyakini bahwa 10^4 CFU atau bahkan kurang sudah mengindikasikan infeksi. Ahli-ahli lain berpendapat bahwa adanya leukosit polimorfonuklear memainkan peran yang penting dalam patologi dan manifestasi klinis ISK. Tidak mungkin menentukan secara tepat jumlah minimum bakteri per mililiter urin yang menyebabkan ISK. Rekomendasi umum untuk pelaporan diberikan berikut ini:

- Kategori 1:** kurang dari 10^4 CFU per ml. Laporkan sebagai *kemungkinan tidak ada ISK*. (Pengecualian: jika ditemukan kurang dari 10^4 CFU per ml dalam urine yang langsung diambil dari kandung kemih melalui pungsi suprapubik atau sistoskopi pada wanita yang bergejala, atau terdapat leukosituria, laporkan hasil identifikasi dan hasil uji kepekaannya).
- Kategori 2:** 10^4 – 10^5 CFU per ml. Jika pasien tanpa gejala, mintalah spesimen urine kedua dan ulangi penghitungan. Jika pasien mempunyai gejala ISK, teruskan untuk identifikasi dan uji kepekaan jika didapatkan satu atau dua jenis koloni bakteri yang berbeda. Jumlah bakteri dalam kisaran ini sangat sesuai untuk ISK pada pasien yang bergejala, atau jika didapatkan leukosituria. Jika jumlah CFU per ml, mutu spesimen urin atau kemaknaan gejala pasien meragukan, harus didapatkan spesimen urin kedua untuk pemeriksaan ulang. Laporkan jumlah CFU.

Kategori 3: Lebih dari 10^5 CFU/ml. Laporkan jumlahnya pada dokter dan teruskan dengan identifikasi dan uji kepekaan jika ditemukan satu atau dua jenis koloni bakteri yang berbeda. Jumlah bakteri ini sangat sesuai untuk ISK pada semua pasien, termasuk wanita tanpa gejala.

Jika ditemukan lebih dari dua spesies bakteri dalam sampel urin pada kategori 2 dan 3, laporkan sebagai "Kemungkinan tercemar; silakan menyerahkan spesimen bersih yang segar".

Identifikasi

Identifikasi harus dilakukan secepat mungkin. Karena sebagian besar infeksi saluran kemih disebabkan oleh *E. coli*, uji cepat harus digunakan untuk mengidentifikasi koloni berwarna merah pada agar MacConkey.

Uji β -glukuronidase untuk identifikasi cepat *E. coli*¹

Uji ini menentukan kemampuan organisme untuk menghasilkan enzim β -glukuronidase. Enzim tersebut menghidrolisis reagen asam 4-nitrofenil- β -D-glukopiranosiduronat (PGUA) menjadi asam glukuronat dan *p*-nitrofenol. Timbulnya warna kuning menunjukkan reaksi positif.

Prosedur:

1. Siapkan suspensi organisme yang pekat keputihan dalam tabung kecil berisi 0,25 ml larutan garam fisiologis untuk diuji. Suspensi tersebut harus dibuat dari koloni yang tumbuh pada agar MacConkey.
2. Larutkan 300 mg asam 4-nitrofenil- β -D-glukopiranosiduronat (PGUA) dan 100 mg ekstrak ragi (Oxoid L21)² dalam 20 ml buffer fosfat (Tris buffer, pH 8,5). Atur pH menjadi $8,5 \pm 0,1$. Tuang 0,25 ml media ini ke dalam tabung steril sejumlah yang diperlukan. Tutup tabung dengan karet penutup. Beri label pada tabung PGUA dan beri tanggal.
3. Inokulasi satu tabung media PGUA dengan suspensi pekat organisme yang akan diuji. Inkubasi media selama 4 jam pada suhu 35°C. Terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya β -glukuronidase (hasil positif); jika tidak terjadi perubahan warna, hasilnya negatif. Adanya warna kuning berpigmen menunjukkan bahwa hasil tidak dapat dipercaya; pada kasus-kasus demikian, harus digunakan uji-uji lain.

Organisme untuk pengendalian mutu:

<i>Escherichia coli</i>	hasil positif (kuning)
<i>Shigella flexneri</i>	hasil negatif (jernih)

Tablet PGUA tersedia di pasaran.

Uji kepekaan

Uji kepekaan (hal. 90) harus dilakukan hanya pada koloni dengan penampilan serupa yang terisolasi dengan baik, yang dianggap bermakna menurut pedoman yang dipresentasikan di atas. Uji kepekaan umumnya lebih penting pada biakan yang didapat dari pasien yang dirawat atau mempunyai riwayat ISK berulang. Biakan dari pasien-pasien dengan ISK primer mungkin tidak memerlukan uji kepekaan.

¹ Killian M, Borrow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. 1. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Section B, 1976, 84:245-251.

² Tersedia dari Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, Inggris.

Pendahuluan

Infeksi bakteri enterik, yang menyebabkan diare, disentri, dan demam enterik, merupakan masalah kesehatan yang penting di seluruh dunia. Infeksi diare merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular, dan merupakan penyebab kematian anak yang utama. Di negara-negara berkembang, penyakit diare menyebabkan 1,5 juta kematian per tahun pada anak usia 1–4 tahun. Risiko kematian akibat diare pada anak dalam kelompok usia ini adalah 600 kali lebih besar di negara berkembang dibandingkan negara maju. Di beberapa negara berkembang, anak-anak menderita sepuluh episode diare atau lebih dalam setahun.

Anak-anak sering terinfeksi oleh patogen berganda dan bahkan anak tanpa diare cukup sering mengandung patogen potensial dalam tinjanya. Pengamatan dalam berbagai penelitian menunjukkan bahwa imunisasi aktif melalui pajanan berulang dan pemberian air susu ibu yang berlangsung lama dapat melindungi dari efek diaregenik kuman-kuman tersebut. Penelitian-penelitian juga telah menggarisbawahi kesulitan dalam menentukan penyebab suatu episode diare melalui biakan satu spesimen tinja.

Dengan meningkatnya prevalensi HIV/AIDS dan kemoterapi immunosupresif, diare pada pasien-pasien tanggap imun lemah menjadi tantangan yang semakin berkembang. Pasien-pasien dengan HIV/AIDS mungkin datang dengan diare atau mengalami diare pada tahap penyakit yang lebih lanjut, dan infeksi mereka seringkali mengancam jiwa dan sulit disembuhkan. Infeksi bakteri enterik yang teridentifikasi pada pasien HIV/AIDS memiliki daftar yang panjang dan mencakup *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* serta *mycobacteria*. Salmonellosis diperkirakan sekitar 20 kali lebih sering muncul dan 5 kali lebih sering menyebabkan bakteremia pada pasien dengan HIV/AIDS dibandingkan pasien tanpa penyakit tersebut. Di Zaire, pada 84% pasien dengan diare yang berlangsung lebih dari 1 bulan ditemukan seropositif HIV, dan 40% pasien dengan HIV/AIDS mengalami diare persisten.

Agen penyebab dan gambaran klinis

Genus *Salmonella* mencakup lebih dari 2000 serotipe. Banyak di antaranya mungkin menginfeksi manusia dan hewan peliharaan. Pada manusia, *Salmonella* menyebabkan gastroenteritis, demam tifoid, dan bakteremia dengan atau tanpa penyakit metastatik. Gastroenteritis akibat *Salmonella* biasanya dimulai dengan mual, muntah, kolik abdomen dan diare 8–48 jam setelah menelan makanan yang tercemar. Gejala seringkali menetap selama 3–5 hari sebelum sembuh tanpa diobati. Antimikroba tidak akan mempercepat pemulihan klinis, serta dapat memperpanjang masa konvalesen dan status sebagai pembawa tanpa gejala (*asymptomatic carrier*). Uji kepekaan antimikroba dan terapi antimikroba tidak dianjurkan untuk kasus-kasus tanpa penyulit. Terapi antimikroba hanya diindikasikan bila pasien tampak mengalami bakteremia. Beberapa pasien mungkin mengandung *Salmonella* spp dalam tinja atau urinya selama 1 tahun atau lebih, tetapi tetap tanpa gejala. Kira-kira 3% pasien dengan demam tifoid dan 0,2–0,6% orang dengan gastroenteritis *Salmonella* non tifoid akan menghasilkan biakan tinja yang positif selama lebih dari 1 tahun.

Shigella spp. menyebabkan penyakit klinis dengan spektrum luas, yang bervariasi dari infeksi tanpa gejala, diare tanpa demam, sampai disentri berat. Gejala meliputi kram perut, mencedakan yang nyeri dan tidak efektif untuk buang air besar (tenesmus), serta buangan inflamatorik bercampur darah yang sering dengan volume sedikit. *Shigella* spp. merupakan penyebab utama disentri basilar, diikuti *E. coli* enteroinvasif dan enterohemoragik. Banyak kasus yang bermanifestasi sebagai penyakit yang tidak memerlukan pengobatan spesifik. Walaupun demikian, untuk disentri berat atau jika penyebaran sekunder rentan terjadi, diindikasikan terapi antimikroba setelah uji kepekaan mengingat tingginya

resistensi terhadap antimikroba yang sering digunakan di banyak negara. Dikenal empat kelompok *Shigella*, dengan total 39 serotipe dan subtiipe. Grup A (*S. dysenteriae*), grup B (*S. flexneri*), dan grup C (*S. boydii*) mencakup banyak serotipe; hanya ada satu serotipe untuk grup D (*S. sonnei*). *S. dysenteriae* dan *S. flexneri* merupakan spesies *Shigella* yang paling sering diisolasi di negara berkembang, sedangkan *S. sonnei* merupakan spesies yang paling sering diisolasi di negara maju.

Sedikitnya telah diidentifikasi enam kelas *Escherichia coli* penyebab diare: *E. coli* enteropatogenik (EPEC), *E. coli* enterotoksigenik (ETEC), *E. coli* enterohemoragik atau penghasil verotoksin (EHEC atau VTEC), *E. coli* enteroinvasif (EIEC), *E. coli* enteroadhesif (EAEC), serta *E. coli* enteroagregatif (EAaggEC). Empat di antaranya merupakan penyebab umum diare di negara berkembang. Walaupun demikian, identifikasi galur-galur tersebut membutuhkan pemeriksaan serologis, pemeriksaan toksisitas pada biakan sel, pemeriksaan patogenesitas pada hewan, dan teknik pemindai gen (*gene-probe techniques*) yang berada di luar kemampuan laboratorium klinis tingkat menengah. Kemungkinan terdapat identifikasi presumtif suatu strain VTEC karena serotipe VTEC yang tersering, O157:H7, ditandai oleh hasil uji sorbitol yang negatif. Akan tetapi, *E. fergusonii* dan *E. hermannii* juga memberi hasil uji sorbitol yang negatif. Galur *E. coli* yang negatif pada uji sorbitol akan memerlukan identifikasi lebih lanjut dengan penentuan serotipe menggunakan antiserum *E. coli* O157. Adanya produksi verotoksin menunjukkan bahwa kuman tersebut adalah galur VTEC.

Kolera merupakan contoh khas infeksi toksigenik. Semua gejala dapat dikaitkan dengan kehilangan cairan usus yang disebabkan oleh enterotoksin yang dilepaskan oleh *Vibrio cholerae* dalam usus. Volume tinja banyak dan cair, serta tidak mengandung sel radang. Tujuan utama pengobatan adalah penggantian cairan dan pemberian antimikroba hanya berperan sekunder.

V. cholerae menyebar sangat cepat. Kuman ini dapat dibagi menjadi beberapa serotipe berdasarkan variasi pada antigen O somatik; serotipe O1 terdapat dalam dua varian biologik yang diberi nama "klasik" dan "El Tor". Sampai tahun 1992, hanya *V. cholerae* serogrup O1 (klasik atau El Tor) yang diketahui menyebabkan epidemi kolera, dan serogrup lain diperkirakan menyebabkan kolera sporadik dan infeksi di luar usus. Walaupun demikian, pada tahun 1992, suatu wabah kolera yang besar muncul di pesisir timur India dan menyebar dengan cepat ke negara-negara tetangga. Epidemi ini disebabkan oleh serogrup *V. cholerae* O139 yang belum dikenal saat itu. Isolasi *V. cholerae* sejauh ini telah dilaporkan dari 10 negara di Asia Tenggara, tetapi tampaknya kini mengalami penurunan.

V. parahaemolyticus dan beberapa spesies *Vibrio* lainnya (*V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. mimicus*) dan *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) menyebabkan keracunan makanan atau gastroenteritis pada orang-orang yang makan makanan laut mentah atau kurang matang.

Campylobacter jejuni dan *C. coli* telah muncul sebagai patogen enterik utama yang dapat diisolasi sesering *Salmonella* dan *Shigella* spp. hampir di seluruh bagian dunia. Penelitian di Afrika dan Asia pada anak-anak telah menunjukkan tingkat insiden antara 19 sampai 38%, dan presentase penyebar penyakit yang asimtomatik berkisar antara 9 sampai 40%. Penyakit usus bervariasi dari enteritis yang singkat dan sembuh sendiri sampai enterokolitis fulminan dengan diare berat, kolik abdomen, demam, dan nyeri otot. Tinja mula-mula berlendir (mukoid) dan cair dan dapat berlanjut menjadi diare cair yang sangat banyak mengandung darah dan nanah (pus). Gejala umumnya mereda dalam 1 minggu. Kekambuhan terjadi pada sekitar 25% pasien, tetapi umumnya lebih ringan daripada episode awalnya. Infeksi tersebut biasanya sembuh sendiri tanpa terapi antimikroba, dan uji kepekaan biasanya tidak diindikasikan.

Arcobacter butzleri, yang dulu dianggap sebagai *Campylobacter* yang tumbuh pada suhu rendah, akhir-akhir ini dikenal sebagai penyebab penyakit diare pada pasien-pasien di negara berkembang, terutama pasien anak.

Infeksi manusia oleh *Yersinia enterocolitica* telah dilaporkan terutama dari Eropa Utara, Jepang, dan Amerika Serikat. Sebagian besar isolat telah teridentifikasi dari anak-anak yang mengalami diare sporadik.

Clostridium difficile merupakan penyebab primer penyakit enterik yang terkait dengan terapi antimikroba. Kuman ini menyebabkan penyakit dengan spektrum luas yang berkisar dari diare ringan sampai kolitis pseudomembranosa yang berpotensi menyebabkan kematian. Penemuan pseudomembran kolon pada kolonoskopi bersifat diagnostik untuk kolitis pseudomembranosa; dalam kasus demikian, konfirmasi laboratorium tidak diperlukan. Beberapa uji komersial tersedia bagi laboratorium, meliputi biakan, aglutinasi lateks untuk deteksi protein yang terkait dengan sel, pemeriksaan ELISA untuk sitotoksin dan/atau enterotoksin serta uji toksisitas biakan sel untuk sitotoksin. Banyak pasien rumah sakit mengandung organisme tersebut dalam tinjanya tanpa disertai gejala, khususnya bila pasien tersebut mendapat antimikroba spektrum luas. Oleh karena itu, biakan tanpa adanya manifestasi produksi toksin mempunyai nilai diagnostik yang kecil.

Rotavirus merupakan satu-satunya agen non-bakteri yang dibahas di sini. Virus-virus lain merupakan penyebab diare yang penting, tetapi rotavirus banyak ditemukan di seluruh tempat di dunia dengan tingkat infeksi yang sama baik di negara maju maupun negara berkembang. Sebagian besar infeksi terjadi pada anak berusia 6 sampai 18 bulan, dengan prevalensi yang lebih tinggi selama bulan-bulan bersuhu dingin. Diagnosis dibuat dengan *enzyme immunoassay* (ELISA) atau lebih sederhana dan praktis dengan uji aglutinasi lateks. Reagen-reagen untuk kedua metode pemeriksaan tersebut tersedia di pasaran, tetapi harganya mahal.

Penggunaan sumber daya laboratorium secara tepat

Laboratorium yang berhubungan dengan rumah sakit atau klinik yang ramai di negara berkembang dapat dengan cepat kewalahan oleh banyaknya spesimen. Biakan tidak diperlukan dalam penatalaksanaan efektif pada sebagian besar kasus diare dan disentri, dan pasien-pasien hanya memerlukan rehidrasi dan bukan antimikroba. Beberapa pasien (misalnya pasien dengan demam tifoid) akan memerlukan hasil biakan untuk penatalaksanaan yang sesuai. Masalah yang terus menjadi perhatian adalah bagaimana cara terbaik untuk mendayagunakan sumber daya yang sedikit.

Seringkali aspek-aspek kesehatan masyarakat merupakan yang terpenting, dan laboratorium harus mampu memberikan data yang menjabarkan patogen-patogen enterik tersering di daerah tersebut dan pola kepekaan antimikroba patogen-patogen tersebut, serta meneliti suatu epidemi. Klinisi harus bekerja berdampingan dengan laboratorium. Prosedur yang memungkinkan laboratorium untuk mengembangkan *database* yang sah adalah pengumpulan spesimen secara acak dan sistematis dari sampel pasien diare pada rumah sakit atau klinik tersebut. Dengan menguji hanya sebagian dari sampel tersebut, jumlah spesimen yang ada berkurang dan dapat dilakukan investigasi yang lebih lengkap pada tiap spesimen. Jika sampelnya sistematis (misalnya, setiap pasien kedua puluh lima), hasilnya dapat digunakan untuk memperkirakan infeksi pada seluruh populasi pasien. Jika suatu sindrom klinis yang khas ditemukan pada suatu kelompok umur tertentu, atau selama musim tertentu, laboratorium dapat memusatkan pengambilan sampelnya pada masalah-masalah spesifik tersebut.

Laboratorium dapat memutuskan untuk memeriksa patogen-patogen enterik tertentu saja. *Yersinia enterocolitica* jelas jarang ditemukan di sebagian besar daerah tropis. Jika organisme tersebut tidak ditemukan di daerah yang dilayani oleh laboratorium tersebut, pemeriksaan untuk kuman tersebut dapat ditiadakan. Jika laboratorium memberikan laporan hasil, laporan harus menyebutkan organisme mana yang diperiksa. Jika spesies *Salmonella* dan *Shigella* merupakan patogen satu-satunya yang disingkirkan, laporan jangan membuat pernyataan "Tidak ditemukan patogen". Sebaliknya, harus dinyatakan sebagai "Spesies *Salmonella* dan *Shigella* tidak ditemukan".

Pengambilan dan transpor spesimen tinja

Spesimen tinja harus diambil dalam tahap awal penyakit diare, selayaknya pada saat patogen terdapat dalam jumlah terbanyak, dan lebih baik sebelum pengobatan antimikroba dimulai. Spesimen harus

diambil pada pagi hari supaya tiba di laboratorium sebelum tengah hari, sehingga dapat diperiksa pada hari itu juga. Tinja yang berbentuk harus ditolak. Idealnya spesimen tinja yang segar lebih disukai daripada apusan rektum, tetapi apusan rektum dapat diterima jika pengambilan spesimen tidak dapat dilakukan segera atau jika transpor tinja ke laboratorium tertunda.

Prosedur untuk mengumpulkan bahan tinja

Berikan kepada pasien dua batang kayu dan penampung yang sesuai dengan tutup yang anti-bocor (misalnya, gelas kaca yang bersih, kotak dari plastik atau kardus berlapis lilin, atau penampung khusus dengan sendok yang terpasang pada tutupnya). Penggunaan botol penisilin, kotak korek api, dan daun pisang harus dihindari karena menyebabkan staf laboratorium terpapar pada risiko infeksi.

Instruksikan pada pasien untuk mengumpulkan spesimen tinja pada sepotong kertas tissue atau koran bekas dan memindahkannya ke wadah yang tersedia menggunakan kedua batang kayu tersebut.

Spesimen harus mengandung sedikitnya 5 g tinja dan, jika ada, bagian yang mengandung darah, lendir atau pus. Tinja jangan tercemar urine. Begitu spesimen telah ditempatkan pada penampung, tutupnya harus segera disegel.

Pasien harus diminta mengirimkan spesimen tersebut ke klinik segera setelah pengumpulan. Jika spesimen tidak memungkinkan untuk dikirim ke laboratorium dalam waktu 2 jam setelah pengumpulan, sejumlah kecil spesimen tinja (bersama lendir, darah, dan benang-benang epitel, jika ada) harus diambil dengan dua atau tiga lidi kapas dan dimasukkan ke dalam penampung dengan media transpor (Cary-Blair, Stuart, atau Amies) atau 33 mmol/l buffer gliserol fosfat. Untuk kolera dan *Vibrio* spp. lain, air pepton alkali merupakan media transpor (dan media *enrichment*) yang sangat baik. Patogen dapat bertahan hidup dalam media demikian hingga 1 minggu, bahkan pada suhu ruang, walaupun lebih baik jika disimpan dalam lemari pendingin.

Prosedur untuk mengumpulkan apusan rektum

1. Basahi lidi kapas dengan air steril. Masukkan lidi kapas melewati sfinkter rektum, putar, dan tarik. Periksa lidi kapas untuk melihat noda tinja dan ulangi prosedur tersebut sampai tampak noda yang cukup. Jumlah apusan yang harus dikumpulkan tergantung dari jumlah dan jenis pemeriksaan yang diperlukan.
2. Tempatkan lidi kapas tersebut dalam tabung steril kosong dengan sumbat kapas atau tutup ulir jika akan diperiksa dalam 1–2 jam. Jika apusan harus disimpan lebih lama dari 2 jam, tempatkan dalam media transpor.

Pemeriksaan visual spesimen tinja

1. Periksalah sampel tinja secara visual dan catat yang berikut ini:
 - konsistensinya (berbentuk, tidak berbentuk (lembek), atau cair)
 - warnanya (putih, kuning, coklat, atau hitam)
 - keberadaan komponen abnormal (misal lendir atau darah)
2. Tempatkan secuil kecil spesimen tinja atau apusan rektum bersama dengan sebercak kecil lendir (jika ada) dalam setetes larutan metilen biru 0,05% pada kaca objek bersih dan campur secara merata.
3. Letakkan kaca penutup pada suspensi yang telah diwarnai, jangan sampai terbentuk gelembung udara. Tunggu 2–3 menit. Periksalah sediaan di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif pembesaran kuat ($\times 100$).
4. Catat sel yang dapat dikenali dengan jelas sebagai sel mononuklear atau polimorfonuklear, abaikan sel yang rusak.

Pemeriksaan eksudat selular tinja diare mungkin memberikan petunjuk mengenai organisme terkait:

- kelompokan leukosit polimorfonuklear (>50 sel per lapang pandang besar), makrofag, dan eritrosit khas untuk shigellosis;
- leukosit polimorfonuklear dalam jumlah yang lebih sedikit (<20 sel per lapang pandang besar) ditemukan pada salmonellosis, dan *E. coli* invasif. Pada disentri amuba, sel-selnya sebagian besar rusak (sel hantu/*ghost cells*). Leukosit dan eritrosit juga ditemukan pada sekitar separuh kasus diare akibat *Campylobacter* spp.;
- sedikit leukosit (2–5 sel per lapang pandang besar) ditemukan pada kasus-kasus kolera *E. coli* enterotoksigenik dan enteropatogenik serta diare akibat virus.

Pengayaan (*enrichment*) dan inokulasi spesimen tinja

Media *enrichment* biasanya digunakan untuk isolasi *Salmonella* spp. dan *Vibrio cholerae* dari spesimen tinja. Kaldu selenit F atau tetrathionate dianjurkan untuk *enrichment* *Salmonella* spp. dan air pepton alkali (*alkaline peptone water*/APW) untuk *enrichment* *V. cholerae*. *Enrichment* tidak diperlukan untuk *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, dan *Clostridium difficile*.

Prosedur untuk inokulasi media pengayaan

1. Siapkan suspensi tinja dengan mensuspensikan sekitar 1 g sampel tinja dalam tabung yang mengandung 1 ml larutan saline steril. Jika sampel tinja cair, tidak perlu menambahkan larutan salin. Apusan rektum yang diterima dalam keadaan segar atau dalam media Cary-Blair harus dibilas dengan seksama dalam 1 ml larutan saline. Sebelum mengeluarkan lidi kapas, tekan lidi kapas pada dinding tabung untuk memeras cairan yang tersisa.
2. Tambahkan tiga atau lebih sengkeli suspensi tinja ke dalam kaldu *enrichment*.
3. Inkubasi kaldu selenit F selama 18 jam dan APW selama 6–8 jam. Di beberapa laboratorium dua atau tiga sengkeli suspensi dari APW asal disubkultur ke dalam APW baru dan diinkubasi lagi selama 6–8 jam.
4. Lakukan subkultur koloni dengan mengguratkan satu sengkeli penuh kaldu pada media agar lempeng selektif dan non-selektif.

V. cholerae tumbuh dengan cepat dalam APW dan akan tumbuh lebih banyak dari semua organisme dalam 6–8 jam. Walaupun demikian, setelah 8 jam organisme lain mungkin tumbuh melebihi *V. cholerae*. *V. cholerae* non O1 tumbuh lebih cepat daripada *V. cholerae* O1 dan dapat tumbuh melebihinya jika kedua organisme tersebut ada bersamaan.

Media untuk patogen enterik

Untuk *Shigella* spp., *Salmonella* spp., dan *Y. enterocolitica*, dianjurkan menggunakan media agar lempeng serba guna dengan selektivitas rendah dan media dengan selektivitas sedang atau tinggi. Agar MacConkey dengan kristal violet dianjurkan sebagai media serba guna. Untuk *Y. enterocolitica*, inkubasi agar MacConkey pada suhu 35° C selama 1 hari dan kemudian pada suhu ruang (22–29° C) satu hari lagi.

Agar xylosa-lisin-deoksikolat (XLD) dianjurkan sebagai media dengan selektivitas sedang atau tinggi untuk isolasi *Shigella* dan *Salmonella* spp. Agar deoksikolat-sitrat (DCA), agar enterik Hektoen (HEA), atau agar *Salmonella-Shigella* (SS) merupakan alternatif yang sesuai. *Shigella dysenteriae* tipe 1, *S. sonnei*, dan *E. coli* enteroinvasif tidak tumbuh dengan baik pada agar SS. Walaupun demikian, agar SS dapat digunakan untuk mengisolasi *Y. enterocolitica* jika diinkubasi sebagaimana dijelaskan untuk agar MacConkey. Banyak laboratorium yang menggunakan agar bismuth sulfit untuk mengisolasi *Salmonella typhi* dan spesies *Salmonella* lain.

Untuk *Campylobacter* spp. terdapat beberapa media selektif (Blaser, Butzler, Skirrow) yang mengandung suplemen antimikroba yang berbeda. Walaupun demikian, dapat digunakan agar basa darah dengan 5–10% darah domba yang mengandung kombinasi sefalosporin (15 µg), vancomycin (10 µg), amfoterisin B (2 µg/ml) dan 0,05% ferro sulfat–natrium metabisulfat–natrium piruvat (FBP).

Untuk *Vibrio* spp., diperlukan media yang selektif walaupun banyak galur yang dapat tumbuh pada agar MacConkey. Agar *thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS) selektif untuk *V. cholerae* O1 dan non-O1 serta *V. parahaemolyticus*, tetapi harganya mahal. Agar *telluride taurocholate gelatine* (TTG) merupakan media selektif lain, tetapi tidak tersedia di pasaran. Agar ekstrak daging alkali (MEA) serta agar garam empedu alkali (BSA) adalah media sederhana yang tidak mahal, yang dapat dibuat secara lokal dan memberi hasil yang sangat baik.

Clostridium difficile sulit diisolasi sebelum agar *cefoxitin-cycloserine-fructose* (CCF) dikembangkan. Formula yang menggunakan agar basa kuning telur lebih disukai karena *C. difficile* memberi hasil negatif terhadap lecithinase dan lipase, sedangkan clostridium lain yang umumnya ditemukan dalam usus seperti *C. perfringens*, *C. bifermentans* dan *C. sordelli* bersifat lecithinase positif.

Isolasi primer

Spesimen harus diperiksa dan dibiakkan begitu tiba di laboratorium karena hal ini menghasilkan tingkat isolasi yang paling tinggi untuk *Shigella* dan *Campylobacter* spp. Jika tidak memungkinkan, spesimen harus disimpan pada suhu 4° C.

Inokulum tinja yang pekat harus digunakan untuk media yang sangat selektif dan inokulum tinja encer untuk media yang kurang selektif. Di banyak laboratorium, lempeng agar diinokulasi langsung dengan apusan rektum (*rectal swab*), tetapi harus diperhatikan agar inokulasi tidak terlalu penuh.

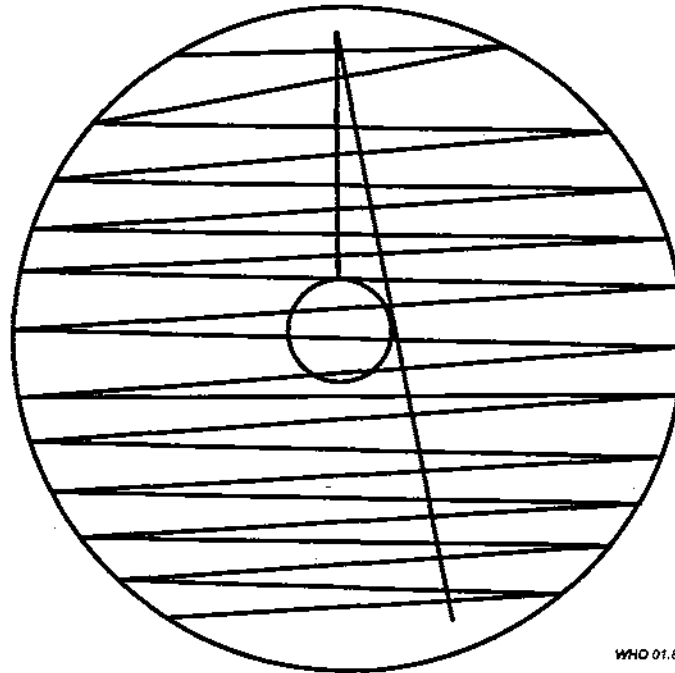
Prosedur untuk inokulasi pada media isolasi primer

1. Media inokulasi yang sangat selektif dengan tiga sengkeli penuh suspensi tinja dan media kurang selektif dengan satu sengkeli saja. Tempatkan inokulum di bagian tengah lempeng agar dan guratkan ke atas dan ke bawah serta menyeberangi lempeng seperti tampak pada Gbr. 6. Prosedur ini akan memaksimalkan jumlah koloni yang terisolasi. Koloni-koloni diskret akan ditemukan di bagian tepi lempeng.
2. Setelah inokulasi, inkubasi lempeng agar. Inkubasi lempeng untuk isolasi *Salmonella*, *Shigella*, dan *Yersinia* spp. serta *V. cholerae* pada suhu 35° C dalam inkubator aerobik (tanpa CO₂); lempeng untuk *Campylobacter* spp. pada suhu 42° C dalam kondisi mikroaerofilik dengan 10% CO₂; dan lempeng untuk *Clostridium difficile* pada suhu 35° C dalam kondisi anaerob.

Atmosfer inkubasi untuk *Campylobacter*

Lempeng untuk isolasi *Campylobacter* spp. harus diinkubasi pada suhu 42–43° C dalam kondisi mikroaerofilik yang mengandung 5% O₂, 10% CO₂ dan 85% N₂. Pertumbuhan flora normal tinja dihambat pada suhu tersebut sedangkan spesies *Campylobacter* yang termotoleran tidak terpengaruh. Walaupun demikian, jika yang diperiksa adalah spesies yang tidak termotoleran, suhu inkubasi harus diturunkan sampai 35–37° C.

- Atmosfer yang cocok untuk pertumbuhan *Campylobacter* spp. dapat dibuat dengan beberapa cara. Metode pilihan akan tergantung pada ukuran dan beban kerja laboratorium, serta biaya relatif.
- Stoples lilin (*candle-jar*) menghasilkan atmosfer O₂ sekitar 17–19% dan CO₂ 2–3%. Kondisi ini tidak ideal untuk pertumbuhan *Campylobacter* spp., dan beberapa galur tidak dapat tumbuh di dalamnya. Walaupun demikian, beberapa peneliti telah menunjukkan bahwa inkubasi dalam suhu 42° C pada media biakan yang diberikan suplementasi FBP akan meningkatkan tingkat isolasi. Suplemen FBP meningkatkan toleransi *Campylobacter* spp. terhadap oksigen dengan

Gambar 6. Inokulasi bakteri pada lempeng biakan

WHO 01.83

menginaktifkan superoksida dan hidrogen peroksida. Kelemahan sistem ini adalah semakin lamanya masa inkubasi dan terhambatnya beberapa *Campylobacter* spp. yang sensitif terhadap oksigen.

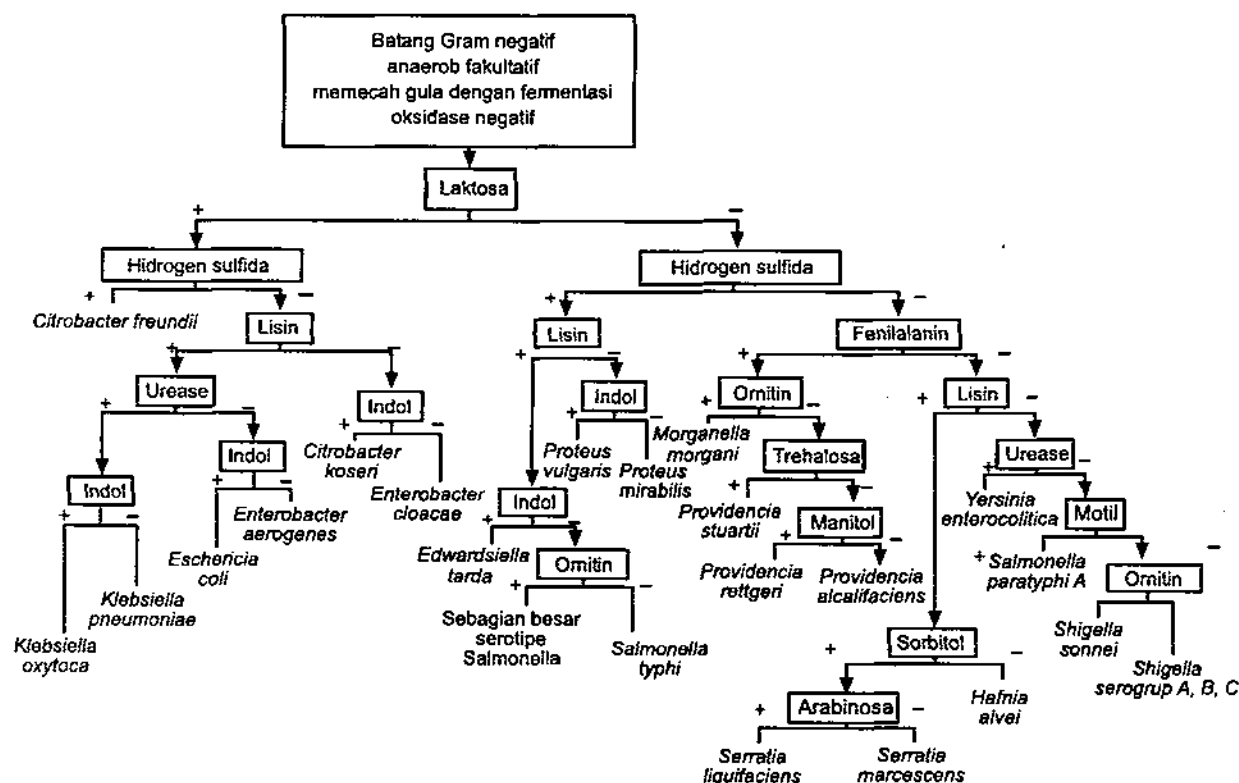
- Sistem lain yang sederhana dan tidak mahal menggunakan teknik biakan bersama (*co-culture*). Lempeng dengan bakteri anaerob fakultatif yang tumbuh cepat diinkubasi bersama lempeng untuk mengisolasi *Campylobacter* spp. dalam wadah kedap udara atau kantung plastik. Bersama dengan tumbuhnya bakteri anaerob fakultatif tersebut, kadar oksigen turun dan kadar CO₂ meningkat. Kelemahan sistem ini adalah waktu inkubasi yang lebih lama dari biasanya untuk pertumbuhan *Campylobacter* spp.
- Paket generator CO₂ dan hidrogen yang mengandung katalis spesifik untuk isolasi *Campylobacter* spp tersedia di pasaran. Paket tersebut ditempatkan dalam stoples anaerob, dan setiap kali stoples dibuka harus digunakan paket yang baru. Untuk mendapatkan isolasi yang maksimal, tidak lebih dari enam lempeng agar ditumpuk dalam stoples.
- Sistem inkubasi kantung plastik juga tersedia di pasaran. Sistem ini terdiri dari sebuah kantung plastik, yang dapat dikempiskan dua atau tiga kali dengan tangan atau penghisap, dan diisi kembali setiap saat, dengan O₂ 5%, CO₂ 10%, dan N₂ 85%.
- Sistem pengosongan-pengisian (*evacuation-replacement*) menggunakan stoples anaerob tanpa katalis. Wadah tersebut dikosongkan dua kali sampai tekanan 38 cm (15 mmHg) dan diisi tiap kali dengan campuran H₂ 10% dan N₂ 90%.

Identifikasi isolat tahap awal

Identifikasi mencakup uji biokimia dan serologik, yang batasannya tergantung pada kapasitas laboratorium tersebut. Diagram alur untuk panduan identifikasi bakteri enterik yang penting diperlihatkan pada Gbr. 7a–c.

Identifikasi koloni-koloni terpisah dengan penampakan khas pada lempeng primer dengan cara memberi tanda pada bagian bawah cawan Petri. Koloni ini akan dipindahkan untuk pemeriksaan lebih lanjut. Jika terdapat lebih dari satu jenis koloni, kerjakan sedikitnya satu koloni untuk tiap jenis.

Gambar 7a. Diagram alur untuk identifikasi awal Enterobacteriaceae yang sering ditemukan



Bakteri yang tidak memfermentasi laktosa seperti *Salmonella* dan *Shigella* spp., menghasilkan koloni-koloni kecil yang tidak berwarna pada agar MacConkey, agar SS, dan DCA. Koloni *Proteus* spp. mungkin dibingungkan dengan *Salmonella* dan *Shigella* spp., khususnya pada agar MacConkey dan DCA, karena tampilannya yang laktosa-negatif. Organisme yang memfermentasi laktosa, seperti *E. coli* dan *Enterobacter/Klebsiella* spp. menghasilkan koloni merah muda sampai merah pada agar MacConkey, agar SS dan DCA. Pada agar XLD, *Shigella* dan *Salmonella* spp. menghasilkan koloni-koloni merah kecil, sebagian besar galur *Salmonella* memiliki bagian tengah yang berwarna hitam. Beberapa galur *Proteus* spp. juga menghasilkan koloni dengan bagian tengah berwarna hitam pada agar XLD. Pada agar bismuth sulfit, *Salmonella typhi* menghasilkan koloni hitam dengan kilau metalik, jika koloninya terpisah dengan baik. *Yersinia enterocolitica* tumbuh pada agar MacConkey dan agar SS sebagai koloni kecil pucat tanpa warna, yang tumbuh paling cepat pada suhu 22–29° C.

***Salmonella* dan *Shigella* spp.**

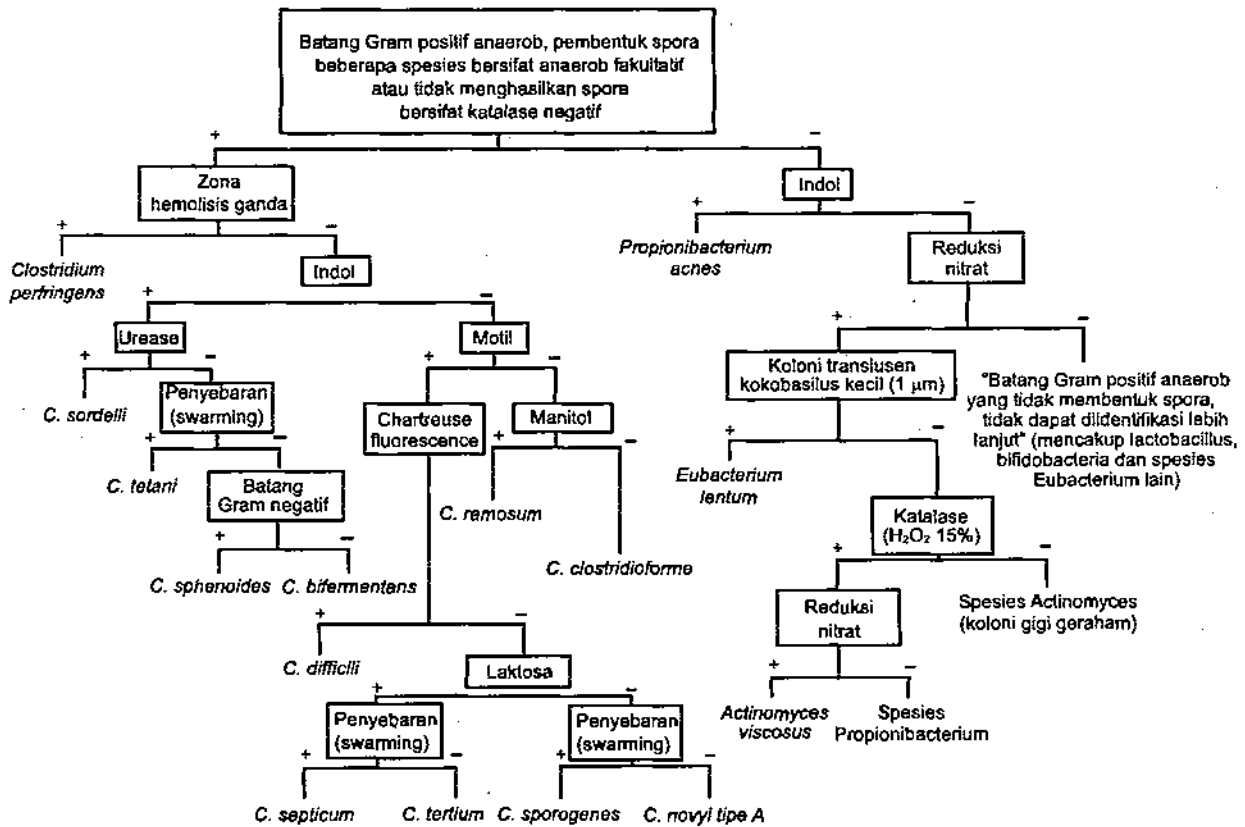
Tiga media diferensial dianjurkan untuk penapisan awal isolat *Salmonella* dan *Shigella* spp.:

- kaldu urea, berbuffer lemah (UREA)
- media motilitas-indol-lisin (MIL)
- agar besi Kligler (KIA)

Prosedur untuk inokulasi dan pembacaan UREA

1. Dengan menggunakan sengkeli untuk menginokulasi, ambillah 2–3 koloni yang tidak memfermentasi laktosa dari lempeng primer dan pindahkan ke tabung yang mengandung UREA.
2. Inkubasi tabung tersebut selama 2–4 jam pada suhu 35° C dan amati adanya perubahan warna menjadi merah muda (urease positif). Buanglah tabung yang urease positif.

Gambar 7b. Diagram alur untuk identifikasi awal batang Gram positif anaerob

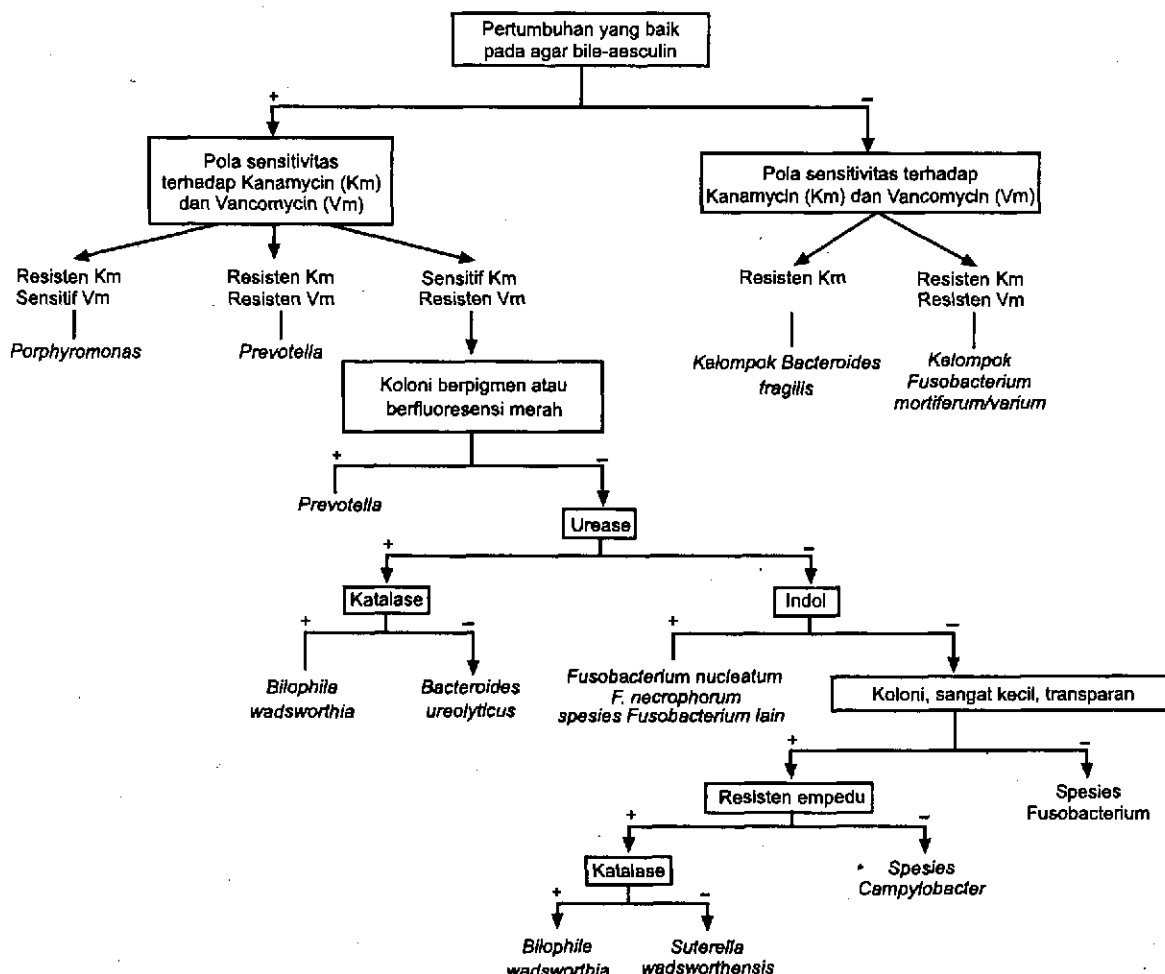


- Lakukan subkultur pertumbuhan dari tabung urease negatif ke MIL dan KIA (lihat di bawah) lalu inkubasi semua tabung, termasuk tabung urease negatif yang mengandung UREA, semalaman pada suhu 35° C dalam inkubator aerob.

Prosedur untuk inokulasi dan pembacaan MIL dan KIA

- Inokulasi MIL dengan memasukkan sengkelit inokulasi lurus sampai 2 mm di atas dasar tabung. Tarik sengkelit di sepanjang garis yang sama.
- Inokulasi KIA dengan menusuk puntung agar dengan sengkelit inokulasi lurus dan menggores lerengnya secara zigzag.
- Berikan label pada semua tabung dengan nomor laboratorium dan inkubasi semalaman pada suhu 35° C.
- Periksalah tabung UREA yang urease-negatif (lihat di atas) untuk melihat adanya reaksi urease yang terlambat. Buanglah biakan-biakan yang urease-positif.
- Periksalah media MIL untuk motilitas, reaksi lisin, dan indol. Organisme yang motil akan menyebar ke dalam media dari garis inokulasi dan menghasilkan pertumbuhan yang menyebar (*diffuse*). Organisme non-motil hanya akan tumbuh di sepanjang garis inokulasi. Reaksi lisin yang positif ditandai oleh reaksi alkali (warna ungu) pada bagian bawah media, dan reaksi negatif ditandai oleh reaksi asam (warna kuning) pada bagian bawah media (disebabkan oleh fermentasi glukosa). Untuk menguji adanya produksi indol, tambahkan 3–4 tetes reagen Kovacs ke media. Warna merah sampai merah muda menunjukkan adanya indol dan menetapnya lapisan kuning cerah menunjukkan hasil yang negatif.
- Periksalah media KIA. Semua Enterobacteriaceae memfermentasi glukosa, menghasilkan asam dan gas atau asam saja, yang menghasilkan lereng berwarna kuning. Jika dihasilkan gas, tampak gelembung atau retakan pada media; bahkan media dalam tabung dapat terdorong ke atas jika

Gambar 7c. Diagram alur untuk identifikasi awal batang Gram negatif anaerob



WHO 01.50

dihasilkan gas dalam jumlah besar (misalnya, pada kasus *Enterobacter* spp.). Jika secara bersamaan laktosa juga difermentasi, puntung dan lereng agar menjadi asam, yaitu berwarna kuning (misalnya, pada kasus *E. coli*). Jika laktosa tidak difermentasi (misalnya, pada kasus *Shigella* dan *Salmonella* spp.), puntung agar menjadi kuning tetapi lerengnya menjadi alkalis (berwarna merah). Timbulnya warna hitam di sepanjang garis tusukan atau pada seluruh media menunjukkan produksi hidrogen sulfida. Catat hasilnya dan buat perkiraan identifikasi organismenya dengan bantuan Tabel 10 dan 11.

Galur *Salmonella* bersifat oksidase negatif, motil, dan indol negatif. Kuman tersebut tidak menghidrolisis urea dan—kecuali *S. paratyphi* A—bersifat lisin dekarboksilase positif. Pada agar KIA *Salmonella* menghasilkan lereng alkali, puntung asam, H_2S dan gas, kecuali *S. typhi* yang tidak menghasilkan gas (anaerogenic), dan sebagian besar galur *S. paratyphi* A yang tidak menghasilkan H_2S . Jika kriteria tersebut terpenuhi, laporkan: “Didapatkan *Salmonella* (identifikasi sementara)”.

Galur *Shigella* bersifat oksidase negatif, non-motil, lisin dekarboksilase negatif dan tidak menghidrolisis urea. Pada KIA, *Shigella* menghasilkan lereng alkali dan puntung asam, tanpa H_2S , dan tanpa gas, kecuali *S. flexneri* serotipe 6 (varian Newcastle dan Manchester) serta *S. boydii* serotipe 14, yang aerogenik. *Shigella* menghasilkan katalase, kecuali *S. dysenteriae* serotipe 1, yang katalase negatif. Jika kriteria tersebut terpenuhi, laporkan: “Didapatkan *Shigella* (identifikasi sementara)”.

Tabel 9. Morfologi koloni bakteri enterik yang umum pada media diferensial dan media lempeng selektif

Spesies	Agar MacConkey dengan kristal violet	Agar XLD	Agar SS	DCA	HEA
<i>Eschericia coli</i>	Merah muda sampai merah mawar	Besar, datar, kuning, opak	Merah muda sampai merah, pertumbuhan terhambat	Merah muda dikelilingi zona presipitasi	Besar, merah salem sampai jingga, dikelilingi zona presipitasi
<i>Shigella</i> spp.	Tidak berwarna	Merah	Tidak berwarna	Tidak berwarna sampai coklat muda	Hijau, basah dan menonjol
<i>Salmonella</i> spp.	Tidak berwarna	Merah, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam	Tidak berwarna, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam	Tidak berwarna sampai coklat muda, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam	Biru-hijau, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam
<i>Enterobacter / Klebsiella</i> spp.	Merah muda, berlendir	Kuning, berlendir	Merah muda, pertumbuhan terhambat	Besar, pucat, berlendir dengan bagian tengah berwarna merah muda	Besar, jingga salem
<i>Proteus / Providencia</i> spp.	Tidak berwarna, penyebaran terhambat	Merah, beberapa <i>Proteus</i> spp mempunyai bagian tengah berwarna hitam	Tidak berwarna, dengan atau tanpa bagian tengah kelabu-hitam	Besar, tidak berwarna sampai coklat muda, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam	Biru-hijau atau salem, dengan atau tanpa bagian tengah berwarna hitam
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Tidak berwarna	Kuning, iregular	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Salem
Enterococci	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh atau tumbuh sedikit	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh atau tumbuh sedikit	Tidak tumbuh atau tumbuh sedikit

XLD: Xylose-Lysine-Deoxycholate; DCA: Deoxycholate-Citrate; SS: Salmonella-Shigella; HEA: Hektoen enteric

Tabel 10. Penafsiran reaksi Enterobacteriaceae pada agar besi Kligler (KIA)

Reaksi	Penafsiran
Puntung asam (kuning) dan lereng alkali (merah)	Hanya memfermentasi glukosa
Asam pada seluruh media (puntung dan lereng kuning)	Memfermentasi glukosa dan laktosa
Alkali pada seluruh media (puntung dan lereng merah)	Tidak memfermentasi glukosa dan laktosa
Gelembung gas pada puntung atau retak pada media	Bakteri yang menghasilkan gas
Hitam pada bagian puntung	Hidrogen sulfida (H_2S) dihasilkan

Tabel 11. Pola reaksi khas untuk Enterobacteriaceae pada agar besi Kligler (KIA)

Reaksi	Gula yang difermentasi	Spesies bakteri
Puntung asam	Glukosa: asam dan gas	<i>Escherichia coli</i>
Lereng asam	Laktosa: asam dan gas	<i>Klebsiella</i>
Gas pada puntung		<i>Enterobacter</i>
Tanpa H ₂ S		<i>Citrobacter diversus</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
Puntung asam	Glukosa: asam dan gas	<i>Salmonella</i>
Lereng alkali	Laktosa: tidak difermentasi	<i>Proteus</i>
Gas pada puntung		<i>Citrobacter freundii</i> *
H ₂ S dihasilkan		
Puntung asam	Glukosa: asam saja	<i>Shigella</i>
Lereng alkali	Laktosa: tidak difermentasi	<i>Yersinia</i>
Tidak ada gas pada puntung		<i>Serratia marcescens</i> *
Tanpa H ₂ S		<i>Providencia stuartii</i> <i>Providencia rettgeri</i> *
Puntung asam	Glukosa: asam dan gas	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Lereng alkali	Laktosa: tidak difermentasi	<i>Hafnia alvei</i>
Gas pada puntung		<i>Serratia marcescens</i> *
Tanpa H ₂ S		<i>Morganella morganii</i>
Puntung netral/alkali	Tidak memfermentasi gula	<i>Alcaligenes</i>
Lereng alkali		<i>Pseudomonas</i>
Tidak ada gas		<i>Acinetobacter</i>
Tanpa H ₂ S		

*Reaksi atipik

Yersinia enterocolitica

Pertumbuhan koloni-koloni kecil berwarna pucat atau tidak berwarna pada agar MacConkey atau agar SS yang diinkubasi semalaman kemungkinan adalah *Yersinia enterocolitica*. Inokulasikan koloni yang khas ke agar KIA dan inkubasi pada suhu 25° C semalaman. Inokulasikan juga koloni yang dicurigai ke dalam dua media UREA dan dua media MIL, inkubasikan masing-masing 1 tabung pada suhu 25° C dan 1 tabung lain pada suhu 35° C. Pada agar KIA, galur *Y. enterocolitica* yang tipikal akan menghasilkan puntung asam, lereng alkali tanpa gas atau H₂S. Jika galur tersebut motil dan urease positif pada suhu 25° C serta non motil dan urease-positif lemah atau urease negatif pada suhu 35° C, laporkan sebagai: "Didapatkan *Yersinia* (identifikasi sementara)".

Vibrio cholerae* dan *V. parahaemolyticus

Galur-galur *Vibrio* tumbuh sebagai koloni-koloni pucat yang tidak memfermentasi laktosa pada agar MacConkey. Pada agar TCBS, *V. cholerae* tumbuh sebagai koloni kuning yang berukuran sedang, cembung dan licin, sedangkan *V. parahaemolyticus* tumbuh sebagai koloni biru-hijau yang besar dan datar. Beberapa galur *V. cholerae* juga dapat tampak berwarna hijau atau tidak berwarna pada agar TCBS karena fermentasi sukrosa yang terlambat. Pada TTGA, koloni mempunyai bagian

tengah berwarna gelap karena reduksi telluride dan dikelilingi oleh zona berawan yang disebabkan oleh aktivitas gelatinase. Pada BSA dan MEA, koloni *V. cholerae* translusen, biasanya dengan permukaan yang rata dan tepi yang berbatas tegas; koloni tersebut mudah dibedakan dengan koloni *Enterobacteriaceae* dengan pencahayaan cahaya oblik atau dengan cahaya matahari bersudut miring. Koloni yang dicurigai harus dilakukan pemeriksaan skrining dengan oksidase dan uji benang (string test).

Prosedur untuk uji oksidase

1. Tempatkan 2–3 tetes reagen oksidase (tetrametil-para-fenilendiamin 1%) pada secarik kertas saring dalam sebuah cawan Petri.
2. Ambil sejumlah kecil pertumbuhan baru dari agar MacConkey dengan sengkeli platina (bukan Nikrom) atau batang kayu atau tusuk gigi yang bersih. Pulas pertumbuhan yang terambil pada bagian kertas saring yang basah.
3. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna ungu tua pada kertas dalam 10 detik. Di antara bakteri-bakteri batang Gram-negatif, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, dan *Alcaligenes* bersifat oksidase positif; semua *Enterobacteriaceae* bersifat oksidase negatif. Reagen oksidase harus diuji secara teratur dengan galur kontrol positif dan negatif.

Prosedur untuk uji benang

1. Teteskan satu tetes larutan 0,5% natrium deoksikolat dalam air pada kaca obyek dan campurkan sejumlah kecil koloni agar MacConkey pada tetesan tersebut.
2. Reaksi yang positif ditunjukkan oleh suspensi tersebut dalam 60 detik: suspensi tidak keruh lagi dan menjadi mukoid; suatu “benang lendir” dapat ditarik jika sengkeli diangkat perlahan dari tetesan tersebut. Beberapa galur *Aeromonas* mungkin menunjukkan benang yang halus dan timbul lebih lambat pada sekitar 60 detik.

Jika uji-uji tersebut positif, pindahkan sebagian dari satu koloni ke KIA, dan setelah diinkubasi semalaman, perhatikan timbulnya puntung kuning, lereng alkali, dan tidak adanya pembentukan gas atau H_2S . Jika ini ditemukan, laporkan sebagai: “Didapatkan *Vibrio cholerae* (identifikasi sementara)”.

Campylobacter jejuni dan *Campylobacter coli*

Periksalah lempeng *Campylobacter* setelah inkubasi 48–72 jam. Koloni yang dicurigai harus diskriminasi dengan tiga uji presumtif: uji oksidase, sediaan basah yang diperiksa di bawah mikroskop lapang gelap atau fase kontras, serta pulasan Gram. Jika mikroskop lapang gelap atau fase kontras tidak tersedia, koloni dapat diskriminasi secara cepat dengan pulasan larutan kristal violet Gram untuk melihat morfologi sel yang khas. Untuk pulasan Gram, karbol fuksin 0,3% dianjurkan sebagai *counterstain*. Spesies *Campylobacter* bersifat oksidase positif, motil dengan motilitas yang meluncur (*darting*) dan berguling (*tumbling*), serta tampak sebagai batang lengkung sederhana atau batang berbentuk spiral (sayap burung camar atau bentuk “S”). Jika ini ditemukan, laporkan sebagai: “Didapatkan *Campylobacter* (identifikasi sementara)”.

Clostridium difficile

Koloni *C. difficile* pada CCFA berukuran besar, kuning, dan seperti kaca buram (*ground glass appearance*). Pada agar darah anaerob, morfologinya bervariasi dan ciri-ciri lainnya harus dicari untuk mendeteksi keberadaan organisme ini. Biasanya, koloni berwarna kelabu, opak, dan non-hemolitik dalam 24–48 jam, tetapi beberapa galur mungkin biru kehijauan karena hemolisis tipe α . Setelah inkubasi 48–72 jam, koloni mungkin mempunyai bagian tengah kelabu muda terang sampai putih. Dengan pengalaman, *C. difficile* mudah dikenali walaupun koloninya bervariasi, karena baunya yang khas, yang menyerupai bau kotoran kuda atau gajah. Jika koloni tersebut bersifat lesitinase negatif dan lipase negatif serta menunjukkan fluoresensi kuning-hijau saat disinari dengan lampu Wood, laporkan sebagai: “Didapatkan *Clostridium difficile* (identifikasi sementara)”.

Identifikasi mikrobiologis tahap akhir

Sebelum laporan akhir dibuat, biakan harus selalu diperiksa apakah pertumbuhannya murni, dan identifikasi harus dipastikan dengan uji biokimia tambahan.

1. Pilihlah satu koloni yang dicurigai, yang terpisah dari koloni lain pada lempeng dan lakukan subkultur dalam kaldu nutrien untuk uji biokimia, subkultur pada agar miring untuk uji serologis dan gurat pada agar MacConkey untuk memastikan kemurnian biakan.
2. Lakukan uji biokimia tambahan sesuai tabel yang ada. Periksa reaksi setelah inkubasi semalaman dan identifikasikan isolat tersebut.

Identifikasi *Shigella* dan *Salmonella* kadang-kadang dapat bermasalah, karena beberapa galur mempunyai reaksi biokimia yang bervariasi dan kemungkinan memiliki antigen yang sama dengan organisme Gram-negatif lain. Galur *E. coli* yang non-motil, laktosa negatif, dan anaerogenik sangat sulit dibedakan dengan *Shigella*, dan identifikasi dapat lebih dipersulit karena, faktanya beberapa galur ini dapat menyebabkan disentri basilar.

Salmonella

Jika hasil uji tahap awal sesuai dengan galur *Salmonella*, inokulasikan pada media omitin dekarboksilase, Simmons sitrat, ONPG, serta air pepton yang diperkaya dengan manitol, rhamnosa, trehalosa, atau xylosa. Periksa reaksi setelah inkubasi semalaman dan identifikasi isolat menurut Tabel 12. Jika hasilnya sesuai dengan biakan *Salmonella*, teruskan dengan identifikasi serologis.

Shigella

Jika hasil uji tahap awal sesuai dengan galur *Shigella*, inokulasikan media omitin dekarboksilase, fenilalanin deaminase, dan ONPG, serta air pepton sukrosa dan xylosa. Periksa reaksi setelah inkubasi semalaman dan identifikasi isolat menurut Tabel 13. Jika hasilnya sesuai dengan biakan *Shigella*, teruskan dengan identifikasi serologis.

Shigella terdiri dari 4 spesies, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, dan *S. sonnei*. Keempat spesies tersebut secara berurutan sering disebut sebagai subgrup A, B, C, dan D. Beberapa serotipe dapat dilakukan identifikasi sementara dengan reaksi-reaksi biokimia dan dibagi menjadi biotipe-biotipe.

S. dysenteriae (subgrup A) mencakup 10 serotipe. Serotipe 1 bersifat kalatase negatif dan menghasilkan toksin Shiga. Serotipe lainnya bersifat katalase-positif. Sebagian besar galur tidak memfermentasi manitol dan laktosa.

S. flexneri (subgrup B) mencakup 8 serotipe. Sebagian besar galur memfermentasi manitol, tetapi tidak memfermentasi sukrosa atau laktosa. Galur Newcastle dari serotipe 6 tidak memfermentasi manitol, tetapi menghasilkan gas dari glukosa; galur Manchester menghasilkan asam dan gas dari glukosa dan manitol; galur Boyd 88 menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas dari glukosa dan manitol.

S. boydii (subgrup C) mengandung 15 serotipe. Organisme ini memfermentasi manitol tetapi tidak memfermentasi laktosa.

S. sonnei (subgrup D) mengandung satu serotipe dengan dua "fase": I dan II. Subgrup ini memfermentasi manitol. ONPG positif, tetapi fermentasi laktosa dan sukrosa terlambat sampai setelah 24 jam (Lihat Tabel 14).

Yersinia enterocolitica

Jika hasil uji tahap awal sesuai dengan galur *Yersinia*, inokulasikan pada agar omitin dekarboksilase, Voges-Proskauer, ONPG, dan Simmons sitrat, serta air pepton yang diperkaya dengan sukrosa, rhamnosa, melibiosa, sorbitol, atau selobiosa. Periksa reaksinya setelah inkubasi semalaman dan

Tabel 12. Reaksi biokimia biotipe *Salmonella* dan bakteri lain

	Penyebaran (swarming)	H ₂ S-KIA	Indol	Lisin	Ornitin	Sitrat	ONPG	Urease	Manitol	Trehalosa	Rhamnosa	Xylosa
<i>Salmonella</i> (sebagian besar serotipe)	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. choleraesuis</i>	-	d	-	+	+	d	-	-	+	-	+	+
<i>S. arizonae</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	-	+w	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>S. paratyphi A</i>	-	d-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+
<i>Proteus</i> spp.	+	+	-/+	-	-/+	v	-	+	-	+	-	+

Singkatan: +: >95% positif; d: 26-74% positif; d-: 5-25% positif; -: <5% positif; v: hasil variabel; w: reaksi lemah. H₂S/KIA: produksi hidrogen sulfida pada agar besi Kligler (KIA); Lisin: lisin dekarboksilase; Ornitin: ornitin dekarboksilase; Sitrat: agar Simmons sitrat; ONPG: β -galaktosidase.

Tabel 13. Reaksi biokimia biotipe *Shigella* dan bakteri lain

	Oksidase	Motilitas	Indol	Lisin	Urease	VP	Sitrat	Ornitin	Fenilalanin	ONPG	Sukrosa	Xylosa
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d+	-	-
<i>Shigella, spesies lain</i>	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli, galur inaktif</i>	-	-	d+	d	-	-	-	d-	-	d	d-	d
<i>Providencia</i>	-	+	+	-	v	-	+	-	+	d-	d	-
<i>Morganella</i>	-	d+	+	-	+	-	-	+	d+	d-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	-	+	-	d+	d-	+	-	+	d-	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	+	d-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-

Singkatan: +: >95% positif; d+: 75-95% positif; d: 26-74% positif; d-: 5-25% positif; -: <5% positif. Lisin: lisin dekarboksilase; VP: Voges-Proskauer; Sitrat: agar Simmons sitrat; Ornitin: ornitin dekarboksilase; Fenilalanin: fenilalanin deaminase; ONPG: β -galaktosidase.

Tabel 14. Reaksi biokimia spesies dan serotipe *Shigella*

	Ornitin dekarboksilase	Fermentasi: laktosa/sukrosa	Fermentasi: manitol	Katalase	Gas glukosa
<i>Shigella dysenteriae</i>					
Serotipe 1 (shigae)	-	-	-	-	-
Serotipe 2 (schmitzii)	-	-	-	+	-
Serotipe 3-10	-	-	-	+	-
<i>Shigella flexneri</i>					
Serotipe 1-5, X dan Y	-	-	+	+	-
Serotipe 6 Newcastle	-	-	-	+	+
Serotipe 6 Manchester	-	-	+	+	+
Serotipe 6 Boyd 88	-	-	+	+	-
<i>Shigella boydii</i>					
Serotipe 1-13, 15	-	-	-	-	-
Serotipe 14	-	-	-	-	+
<i>Shigella sonnei</i>	+	+(lambat)	+	+	-

identifikasi isolat menurut Tabel 15. Jika hasilnya sesuai dengan biakan *Y. enterocolitica*, laporkan sebagai: "*Yersinia enterocolitica*".

Vibrio cholerae

Jika hasil uji tahap awal sesuai dengan galur *Vibrio*, inokulasikan pada agar ornitin dekarboksilase, Simmons sitrat, serta air pepton sukrosa; lalu inkubasi semalaman. Jika salah satu reaksi tersebut negatif, lakukan pengujian untuk melihat hidrolisis eskulin, Voges-Proskauer, serta fermentasi manitol, arabinosa dan arbutin. Periksa reaksi setelah inkubasi semalaman dan identifikasi isolat sesuai Tabel 16.

Jika tersedia serum anti *Vibrio cholerae* serogrup O1 yang spesifik, lakukan uji aglutinasi cepat dengan kaca objek. Jika terdapat aglutinasi makroskopik, laporkan sebagai: "*Vibrio cholerae* O1". Jika tidak tersedia anti-serum atau identifikasi meragukan, kirimlah isolat tersebut ke laboratorium rujukan.

Pembedaan *V. cholerae* O1 menjadi biotipe klasik dan El Tor tidak diperlukan dalam pengobatan atau kontrol, tetapi untuk beberapa isolat, hal tersebut harus dilakukan dengan salah satu uji berikut ini (Tabel 17).

Uji hemaglutinasi tak langsung

1. Siapkan suspensi 2,5% eritrosit ayam atau domba dengan sentrifugasi dan pengenceran berulang dalam larutan saline.
2. Bagilah sebuah kaca objek bersih menjadi beberapa kotak dengan pensil dan tempatkan satu sengkeli (3 mm) suspensi eritrosit dalam tiap kotak.
3. Tempatkan satu bagian kecil koloni dari agar atau lereng KIA pada tiap suspensi eritrosit dan campur rata.

Penggumpalan eritrosit terjadi dalam 30-60 detik dengan galur biotipe El Tor. Galur yang diketahui menyebabkan hemaglutinasi (El-Tor) dan tidak menyebabkan aglutinasi harus digunakan sebagai kontrol untuk setiap suspensi eritrosit baru. Galur biotipe klasik yang baru diisolasi biasanya meng-

Tabel 15. Reaksi biokimia *Yersinia enterocolitica* dan spesies *Yersinia* non-patogenik lainnya

	MIL	Urease	Ornitin	VP 25°C	Sitrat	Sukrosa	Ramnosa	Melobiosa	Sorbitol	Selobiosa
<i>Y. enterocolitica</i>	+/-	+	+	v	-	v	-	-	+	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+/-	+	+	+	d	+	+	-	+	+
<i>Y. intermedia</i>	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Singkatan: +: >95% positif; d: 26-74% positif; -: <5% positif; v: hasil bervariasi; MIL: media motilitas-indol-lisin; VP 25°C: agar Voges-Proskauer yang diinkubasi pada suhu 25°C; Sitrat: agar Simmons sitrat.

*kecuali biotipe 5

Tabel 16. Reaksi biokimia untuk *Vibrio* yang ditemukan dalam tinja

	Oksidase	KIA Puntung/ lereng	MIL	Ornitin	Sitrat	Sukrosa	Manitol	Arabinosa	Eskulin	Keterangan
<i>Vibrio cholerae</i>	+	K/A	+/+/+	+	+	+	+	-	-	
<i>V. mimicus</i>	+	v/A	+/+/+	+	+	-	+	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	K/A	+/+/+	+	-	-	+	d+	-	
<i>V. fluvialis</i>	+	K/A	+/d/-	-	+	+	+	+	-	
<i>V. fumiisii</i>	+	K/AG	+/+/-	-	+	+	+	+	-	
<i>V. hollisae</i>	+	K/A	+/+/-	-	-	-	-	+	-	sulit tumbuh
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	A/AG	+/+/+	-	d	+	+	+	+	Arb +/- VP+
<i>A. caviae</i>	+	A/A	+/+/-	-	+	+	+	+	d	Arb -/ VP-
<i>A. veronii</i> biotipe <i>sobria</i>	+	A/AG	+/+/+	-	+	+	+	-	-	Arb -/ VP+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	K/A	+/+/+	+	-	-	-	-	+	Arb -/ VP-

Singkatan: +: >95% positif; d+: 75-95% positif; d: 26-74% positif; -: <5% positif; KIA: agar besi Kligler; MIL: media motilitas-indol-lisin; Ornitin: ornitin dekarboksilase; Eskulin: hidrolisis eskulin; K: alkali; A: asam; G: gas; Arb: fermentasi arbutin; VP: Voges-Proskauer.

Tabel 17. Perbedaan biotipe *Vibrio cholerae*

	Biotipe	
	Klasik	El Tor
Hemaglutinasi	Reaksi negatif, tidak tumbuh*	Reaksi positif, tumbuh*
Polimiksin B (50 unit)	Sensitif	Resisten
Voges-Proskauer	Reaksi negatif, tidak tumbuh*	Reaksi positif, tumbuh*
Hemolisis	Reaksi negatif, tidak tumbuh	Bervariasi

*Reaksi aberan mungkin terjadi

hasilkan uji yang negatif, tetapi galur laboratorium dari biotipe klasik yang sudah lama mungkin tidak selalu menghasilkan reaksi negatif.

Uji kepekaan Polimiksin B

1. Sebarkan satu sengkeli penuh isolat dari biakan air pepton semalam pada agar Mueller-Hinton atau agar ekstrak daging.
2. Tempatkan cakram uji kepekaan yang mengandung 50 unit polimiksin B di tengah biakan.
3. Tempatkan lempeng agar dalam lemari pendingin selama 1 jam.
4. Inkubasi lempeng tersebut semalaman pada suhu 35° C.

Galur yang diketahui sebagai biotipe klasik dan El Tor harus selalu digunakan sebagai kontrol. Galur klasik bersifat sensitif terhadap polimiksin B dan zona hambatan bening tampak di sekeliling cakram. Galur El Tor bersifat resisten dan zona hambatan tidak terbentuk.

Campylobacter jejuni dan *Campylobacter coli*

Hanya sedikit uji pengidentifikasi spesies dan subspecies *campylobacter* yang tersedia di laboratorium klinis. Spesies *Campylobacter* biasanya dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan suhu tumbuhnya: spesies termotoleran, yang tumbuh pada suhu 42–43° C dan spesies tidak termotoleran, yang tumbuh pada suhu 15–25° C.

Spesies termotoleran adalah *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, dan beberapa galur *C. hyointestinalis*. *C. lari* dan *C. hyointestinalis* bersifat resisten terhadap asam nalidiksik; sebaliknya *C. jejuni*, *C. coli* dan *C. upsaliensis* bersifat sensitif. *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, dan *C. lari* bersifat resisten terhadap sefalotin; sebaliknya *C. hyointestinalis* dan *C. upsaliensis* bersifat sensitif. Perbedaan antara kelompok-kelompok tersebut dibuat berdasarkan hidrolisis hipurat dan produksi hidrogen sulfida pada agar besi Kligler (KIA).

Spesies yang tidak termotoleran adalah *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. fetus*, dan *Arcobacter butzleri*. *C. jejuni* subsp. *doylei* tidak akan tumbuh pada suhu 15° C ataupun 25° C; *C. fetus* akan tumbuh pada suhu 25° C tetapi tidak tumbuh pada suhu 15° C; *A. butzleri* akan tumbuh pada kedua suhu tersebut. *A. butzleri* resisten terhadap sefalotin; *C. jejuni* subsp. *doylei* dan *C. fetus* sensitif terhadap sefalotin (Tabel 18).

Identifikasi serologis

Salmonella

Tata nama dan klasifikasi *Salmonella* telah berubah beberapa kali dan masih dalam diskusi. Menurut tata nama saat ini, semua spesies *Salmonella* tergabung dalam satu genus yang dibagi menjadi enam subgrup (disebut juga subspecies), termasuk genus terdahulu, *Arizona*. Subgrup 1 sesuai dengan

Tabel 18. Identifikasi biokimia spesies *Campylobacter* yang ditemukan dalam tinja

	Pertumbuhan pada			H ₂ S/KIA	Hidrolisis hipurat ^a	Reduksi nitrat	Kepekaan terhadap	
	15° C	25° C	42° C				Asam nalidiksas ^b	Sefalotin ^c
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	-	-	-	-	d	-	S	S
<i>C. coli</i>	-	-	+	+	-	+	S	R
<i>C. lari</i>	-	-	+	-	-	+	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	+	-	-	+	S	S
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	+	-	-	-	+	R	S
<i>C. hyointestinalis</i>	-	+	v	+	-	+	R	S
<i>Arcobacter butzleri</i> ^d	+	+	-	-	-	+	v	R

Singkatan: +: >95% positif; d: 75-95% positif; d: 26-74% positif; d-: 5-25% positif; -: <5% positif; v: hasil bervariasi; S: sensitif; R: resisten; H₂S/KIA: agar besi Kligler

^aHanya warna ungu tua yang dianggap positif.

^bCakram asam nalidiksas 30 µg.

^cCakram sefalotin 30 µg.

^dKatalase negatif atau katalase positif lemah; agar besi Kligler.

salmonella-salmonella yang khas dan mencakup di antaranya: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*. Subgrup ini mencakup lebih dari 2000 serotipe, yang dapat dibedakan berdasarkan formula antigeniknya (antigen O, H, dan Vi). Serotipe-serotipe dalam subgrup I selanjutnya diberi nama selayaknya spesies sejati: *Salmonella* subgrup I serotipe *typhimurium*, secara singkat disebut sebagai *S. typhimurium*. Lebih dari 99% isolat salmonella dari manusia termasuk ke dalam subgrup I.

Antigen-antigen yang penting untuk penentuan serotipe spesies *Salmonella* adalah antigen somatik atau antigen O, dan antigen flagella atau antigen H. Antigen O terdapat pada organisme motil maupun non-motil, dan resisten terhadap pemanasan sampai mendidih; antigen H hanya terdapat pada organisme yang motil dan sensitif terhadap pemanasan sampai mendidih. Sebagian besar spesies *Salmonella* bersifat bifasik pada keadaan motil dan dapat menunjukkan dua bentuk antigenik yang disebut fase 1 dan 2. Kedua fase ini mempunyai antigen O yang sama, tetapi antigen H yang berbeda. Untuk dapat mengidentifikasi serotipe diperlukan identifikasi antigen H spesifik pada kedua fase tersebut. Hal ini mungkin tidak selalu jelas, dan kemungkinan diperlukan supresi fase untuk memastikan fase latennya.

Antigen O dinamai menggunakan angka Arab. Antigen H fase 1 dinamai dengan huruf Romawi kecil dan antigen H fase 2 dengan angka Arab. Sebagai contoh, rumus antigen untuk *S. typhimurium* adalah 1,4,[3],12:i:1,2, dengan antigen O 1, 4, 5 dan 12; fase 1 antigen H adalah "i" dan antigen fase 2 adalah 1 dan 2. Tanda kurung menunjukkan bahwa antigen tersebut mungkin tidak ditemukan dan antigen yang digarisbawahi menunjukkan bahwa antigen tersebut terkait dengan konversi lisogenik oleh bakteriofaga. Perubahan dalam struktur antigen ini hanya terjadi bila terdapat bakteriofaga dan mungkin merupakan satu-satunya perbedaan antara serotipe-serotipe tertentu.

Spesies *Salmonella* telah dikelompokkan berdasarkan keberadaan antigen O tertentu. Grup tersebut sering disebut sebagai skema Kauffmann-White. Huruf besar Romawi menunjukkan grup O. Pada skema yang asli, grup-grup tersebut adalah A, B, C, D, dan E; grup-grup tersebut kemudian berkem-

bang menjadi A–Z dengan 4 subgrup dalam grup C, 3 di D, 4 di E, dan 2 di G. Grup O ditandai dengan adanya antigen-antigen O berikut:

Grup:	A	B*	C ₁	C ₂	D	E ₁	F
Antigen:	2	4;5	6;7	6;8	9	3;10	11

Terdapat variasi-variasi lain dalam struktur antigen: perubahan tampilan koloni dari licin menjadi kasar, serta ada atau tidak adanya antigen Vi. Jika ada, antigen Vi mencegah aglutinasi dengan antiserum O homolog. Antigen Vi biasanya ditemukan pada isolat segar dan hilang dengan cepat selama penyimpanan biakan. Antigen Vi penting untuk mengidentifikasi *S. typhi*, yang sering kali tidak beraglutinasi dengan antiserum H heterolog.

Prosedur untuk analisis antigen O somatik

Uji aglutinasi kaca objek langsung

1. Biarkan larutan saline dan reagen mencapai suhu ruang sebelum melakukan uji.
2. Teteskan setetes larutan saline pada sebuah kaca objek bersih.
3. Dengan sengkeli steril, emulsikan sedikit pertumbuhan dari lereng agar yang lembab ke dalam tetesan saline untuk menghasilkan suspensi yang merata dan keruh.
4. Periksa suspensi bakteri tersebut dengan lup atau di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran rendah ($\times 10$) untuk memastikan bahwa suspensi tersebut tidak mengalami autoaglutinasi dalam larutan saline.
5. Dengan sengkeli 10 μ l, angkat 1 tetes antiserum O *Salmonella* polivalen (A–I dan Vi), dan tempatkan pada kaca objek tepat di sebelah suspensi bakteri.
6. Campur antiserum dan suspensi bakteri, lalu miringkan kaca objek ke depan dan ke belakang selama 1 menit. Carilah penggumpalan sambil mengamati suspensi di bawah cahaya terang. Penggumpalan yang jelas tampak pada saat itu menunjukkan hasil positif.
7. Jika hasilnya positif, ulangi uji kaca objek dengan antiserum faktor tunggal (*single-factor*).

Beberapa *Salmonella* mempunyai antigen kapsul (Vi), dan dalam bentuk hidup atau tidak dipanaskan, tidak beraglutinasi dengan antiserum grup C1 (O:6,7) atau grup D (O:9). Panaskan suspensi dalam air mendidih selama 20 menit untuk menyingkirkan antigen Vi, dinginkan, pisahkan bakteri dengan sentrifugasi, suspensikan ulang dalam larutan saline baru, dan uji dengan antiserum yang sama.

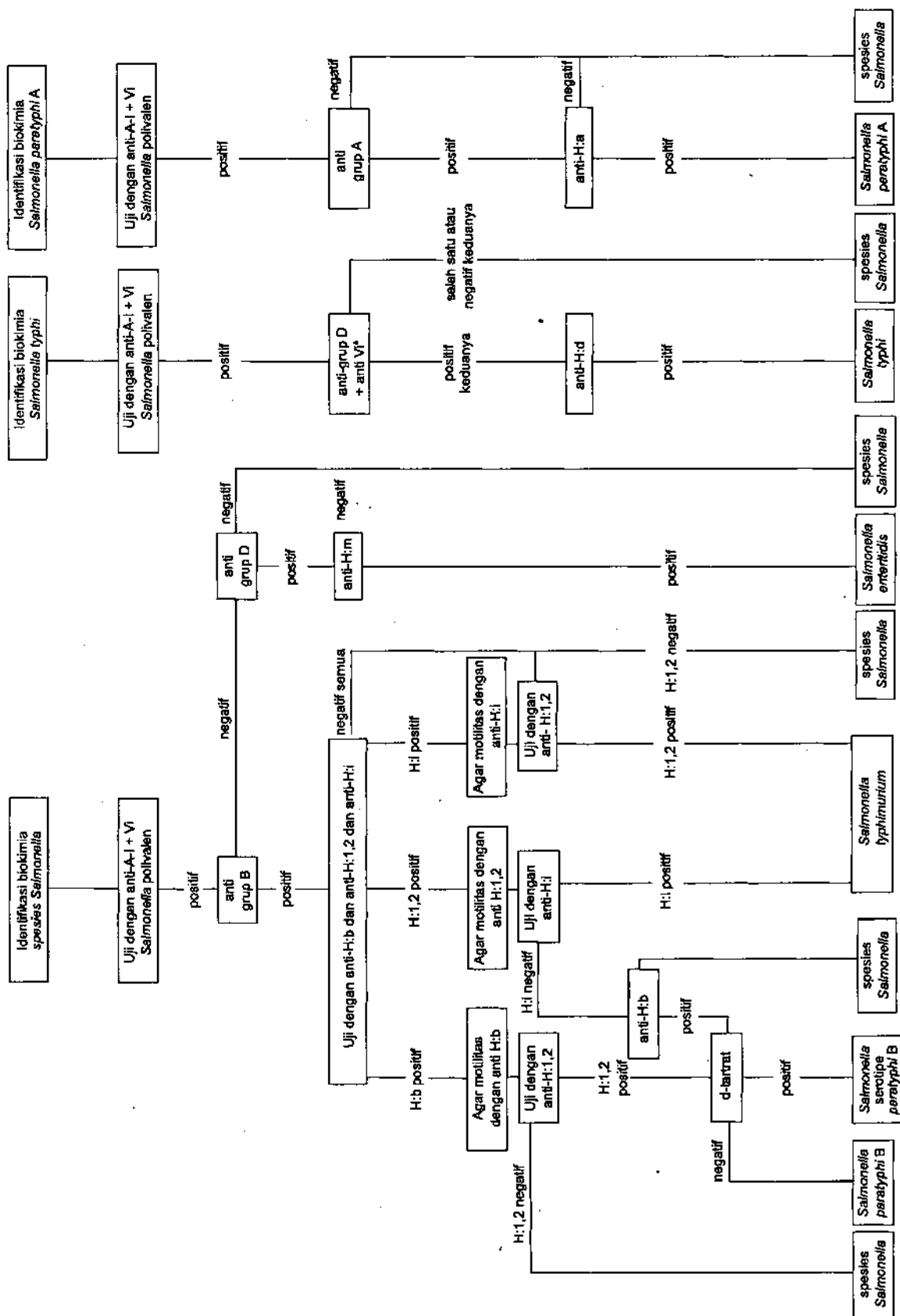
Prosedur untuk analisis antigen H

Identifikasi tahap awal antigen flagella (H) yang utama dapat dibuat dengan uji aglutinasi kaca objek langsung seperti yang dijelaskan untuk antigen O somatik. Kadangkala, motilitas organisme yang diuji perlu ditingkatkan dengan membuat beberapa kali pemindahan secara berturut-turut dalam medium nutrisi semi-solid ("*swarm agar*", lihat di bawah). Antiserum terhadap antigen-antigen tersebut tersedia secara komersial. Walaupun demikian, supresi fase sering diperlukan saat dibutuhkan identifikasi kedua fase flagella untuk klasifikasi. Hal ini seringkali membutuhkan suatu inversi fase dengan serum yang dirancang untuk tujuan tersebut.¹

1. Siapkan media nutrisi semi-solid yang mengandung 0,2–0,4% agar. Masukkan 1 ml medium ke tabung-tabung reaksi.
2. Gantilah tutup gabus pada tabung reaksi dengan sumbat kapas.
3. Cairkan agar dalam air mendidih dan tempatkan tabung yang diuji bersama agar yang sudah meleleh dalam penangas air bersuhu 45° C selama 30 menit.
4. Tuliskan nomor spesimen dan antiserum H (H:b, H:i, dan H:1,2) pada tiap tabung reaksi. Sertakan satu tabung kontrol.

* Semua *Salmonella* subgrup B mengandung antigen 4, tetapi hanya beberapa yang mengandung antigen 5.

¹ Tersedia dari Statens Serum Institut, 5 Artillerivej, 2300 Copenhagen S, Denmark.



* Jika hanya anti-Vi yang bereaglutinasi dengan organisme, ditilkan suspensi bakteri dan ubangi uji dengan antiserum O:D

5. Tambahkan 10 µl antiserum H heterolog dari tiap inversi fase ke dalam agar yang sesuai, kocok tabung reaksi dengan hati-hati, dan biarkan mengeras sebagai agar miring.
6. Buat suspensi pekat koloni isolat dalam larutan saline, gurat lereng dengan sengkeli, dan inkubasi semalaman.
7. Dengan sengkeli penginokulasi, emulsikan sebercak biakan pada lereng ke dalam satu tetes larutan salin.
8. Dengan sengkeli 10 µl, ambil 1 tetes dari salah satu antiserum H heterolog dan tempatkan pada kaca objek tepat di samping suspensi bakteri.
9. Campur antiserum dengan suspensi bakteri dan miringkan kaca objek ke depan dan ke belakang selama 1 menit. Perhatikan adanya penggumpalan sambil mengamati suspensi tersebut di bawah cahaya terang. Penggumpalan yang jelas selama waktu ini adalah hasil yang positif.
10. Ulangi uji aglutinasi dengan antiserum heterolog lain jika perlu, dan identifikasi serotipe dengan bantuan diagram alur pada hal 67.

Salmonella typhi

Untuk memastikan identifikasi biokimia, ujliah dalam antiserum Vi, O grup D (O:D), dan H:d. Biakan yang beraglutinasi dalam Vi mungkin tidak beraglutinasi (negatif) dalam O:D karena di-hambat oleh antigen Vi. Hilangkan antigen Vi dengan memanaskan suspensi selama 20 menit pada suhu 100° C lalu uji kembali dalam antiserum O:D. Jika positif dalam Vi, O:D, dan H:d, laporkan sebagai: "*Salmonella typhi*". Jika positif hanya dalam O:D, laporkan sebagai: "*Salmonella*, grup D".

Salmonella paratyphi A

Untuk memastikan identifikasi biokimia, uji dengan antiserum *Salmonella* grup A. Jika positif dengan antiserum grup A, uji dengan antiserum H:a, dan jika positif, laporkan sebagai: "*Salmonella paratyphi A*". Jika negatif dengan H:a, laporkan sebagai: "*Salmonella* grup A". Jika non-motil, organisme tersebut mungkin adalah *S. flexneri* tipe 6 atau *S. boydii* tipe 13 atau 14, dan harus diuji dengan antiserum *Shigella* B dan D.

Salmonella, serotipe lain

Jika uji praduga (*presumptive*) menunjukkan *Salmonella* yang khas, ujliah dengan antiserum *Salmonella* O grup A, B, C, D, dan E.

- Jika positif dalam antiserum grup B, uji dengan antiserum flagella H:b, H:i dan H:1,2. Jika positif dengan antiserum H:b, organismenya kemungkinan adalah *S. wien* atau *S. paratyphi B*. *S. wien* dapat dibedakan dari *S. paratyphi B* dengan mengujinya dengan antiserum H:1,w dan H:2 (jika tersedia). *S. wien* bereaksi dengan H:1,w dan *S. paratyphi B* dengan H:2.
- Jika positif dengan antiserum H:i atau H:1,2, buatlah suatu inversi fase dan uji dengan antiserum H heterolog. Jika positif, laporkan sebagai: "*S. typhimurium*". Jika negatif, laporkan sebagai: "*Salmonella*, grup B".
- Jika positif dengan antiserum grup C, laporkan sebagai: "*Salmonella*, grup C".
- Jika positif dengan antiserum grup D, uji dengan antiserum Vi, H:d, dan H:m. Jika positif dengan Vi atau H:d, laporkan sebagai: "*Salmonella typhi*". Jika positif dengan H:m, laporkan sebagai: "*Salmonella enteritidis*". Jika negatif dengan Vi, H:d, dan H:m, laporkan sebagai: "*Salmonella*, grup D".
- Jika secara biokimia galur tersebut adalah *Salmonella* tetapi negatif dengan seluruh grup antiserum O, laporkan sebagai: "Dugaan spesies *Salmonella*" dan rujuk ke Pusat Rujukan Nasional.

Shigella

Shigella dapat dibagi lagi menjadi serogrup dan serotipe dengan uji aglutinasi kaca objek dan tabung dengan antiserum O spesifik. Aglutinasi kaca objek biasanya sudah cukup jika hasilnya jelas. Suspensi antigen harus dibuat dari media non-selektif seperti agar nutrisi atau KIA, dan suspensi harus diamati untuk melihat autoaglutinasi sebelum antiserum ditambahkan.

Uji dengan antiserum *Shigella* grup A, B, C dan D

- Jika aglutinasi terjadi dengan grup A, laporkan sebagai: "*Shigella dysenteriae*". Uji dengan antiserum *S. dysenteriae* tipe 1. Jika positif, laporkan sebagai: "*S. dysenteriae* tipe 1".
- Jika aglutinasi terjadi dengan grup B, laporkan sebagai: "*Shigella flexneri*".
- Jika aglutinasi terjadi dengan grup C, laporkan sebagai: "*Shigella boydii*".
- Jika aglutinasi terjadi dengan grup D, laporkan sebagai: "*Shigella sonnei*".

Kadang-kadang galur *Shigella* gagal beraglutinasi dalam antiscrum homolog karena adanya antigen K. Pemanasan suspensi galur dalam larutan saline di dalam penangas air mendidih selama 20 menit dan pengulangan uji tersebut dapat memberi hasil sebaliknya.

Organisme Gram-negatif lain mungkin mempunyai antigen yang sama dengan galur *Shigella* dan memberi hasil aglutinasi positif palsu dengan serum penentu tipe *Shigella*. Contoh bakteri yang diketahui menunjukkan reaksi silang ini adalah *Plesiomonas shigelloides* dan *Shigella sonnei* fase 1, serta galur tertentu *Hafnia* dan *Shigella flexneri* serotipe 4a; tetapi yang lebih penting adalah reaksi silang dengan beberapa galur *E. coli* penyebab diare.

Yersinia enterocolitica

Y. enterocolitica mempunyai beberapa antigen somatik (O), yang telah digunakan untuk membagi spesies tersebut menjadi sedikitnya 17 serogrup. Sebagian besar infeksi manusia di Kanada, Eropa, dan Jepang disebabkan oleh serotipe O3; Infeksi oleh serotipe O9 telah dilaporkan terutama dari negara-negara Skandinavia, dan infeksi oleh serotipe O8 hampir seluruhnya dari Amerika. *Y. enterocolitica* O9 bereaksi silang serologis dengan *Brucella* spp.

Infeksi saluran napas atas

Pendahuluan

Saluran napas atas terbentang dari laring sampai cuping hidung serta mencakup orofaring dan nasofaring dengan rongga-rongga yang menghubungkannya, sinus, dan telinga tengah. Saluran napas atas dapat menjadi lokasi beberapa jenis infeksi:

- faringitis, kadang-kadang mencakup tonsilitis, dan menyebabkan “sakit tenggorokan”
- nasofaringitis
- otitis media
- sinusitis
- epiglottitis.

Dari semua infeksi di atas, faringitis adalah yang paling sering; selain itu, infeksi yang tidak diobati mungkin mempunyai sekuele yang serius. Hanya faringitis yang akan dibahas di sini.

Sebagian besar kasus faringitis disebabkan oleh virus dan sembuh sendiri dalam perjalanan penyakit. Walaupun demikian, sekitar 20% kasus disebabkan oleh bakteri dan biasanya memerlukan pengobatan dengan antibiotik yang tepat. Karena dokter sering sulit membedakan faringitis viral dengan faringitis bakteri berdasarkan klinis semata, idealnya pengobatan, harus didasarkan pada hasil pemeriksaan bakteriologis.

Diagnosis bakteriologis faringitis semakin dipersulit dengan banyaknya flora normal campuran di orofaring yang terdiri dari bakteri aerob dan anaerob. Flora normal umumnya lebih banyak dari patogen dan peran ahli bakteriologi adalah membedakan antara bakteri komensal dan patogen. Di mana pun itu, hanya yang bersifat patogen yang dilaporkan ke dokter.

Flora normal faring

Flora normal faring mencakup sejumlah besar spesies yang tidak perlu diidentifikasi penuh maupun dilaporkan bila ditemukan dalam biakan tenggorok:

- *Streptococcus viridans* (α -haemolyticus) dan pneumokokus
- *Neisseria* spp. non patogen
- *Moraxella* (dulu *Branhamella*) *catarrhalis* (ini dapat juga mmenjadi patogen respiratorik)
- stafilokokus (*S. aureus*, *S. epidermidis*)
- difteroid (dengan pengecualian *C. diptheriae*)
- *Haemophilus* spp.
- ragi (*Candida* spp.) dalam jumlah terbatas
- berbagai kokus Gram positif dan batang Gram-negatif obligat anaerob, spirochaeta dan bentuk-bentuk filamentosa.

Tenggorokan pasien-pasien tua, imunodefisien, atau kurang gizi, khususnya jika telah mendapat antibiotik, dapat menjadi kolonisasi *Enterobacteriaceae* (*Eschericia coli*, *Klebsiella* spp., dll) dan kelompok Gram-negatif yang tidak memfermentasi (*Acinetobacter* spp. dan *Pseudomonas* spp.). Pasien-pasien demikian mungkin juga mempunyai proliferasi *S. aureus* atau *Candida* spp., atau jamur mirip ragi lain dalam faringnya. Walaupun mikroorganisme ini tidak menyebabkan faringitis, kecuali bila disertai granulositopenia, dianjurkan untuk melaporkan isolat-isolat demikian kepada klinisi, mengingat organisme tersebut sekali waktu mengindikasikan adanya (atau kadang-kadang menyebabkan) infeksi saluran napas bawah (misalnya, pneumonia) atau bakteremia. Walaupun demikian, antibiogram tidak boleh dikerjakan secara rutin pada mikroorganisme yang berkolonisasi tersebut.

Agan bakteri faringitis

Streptococcus pyogenes (Lancefield grup A) sejauh ini adalah penyebab tersering faringitis dan tonsilitis bakterialis. Infeksi ini khususnya sering terjadi pada anak kecil (5–12 tahun). Jika faringitis streptokokal disertai dengan ruam kulit yang khas, pasien dikatakan menderita *scarlet fever* (demam merah). Pada bayi, infeksi tenggorok streptokokal mungkin sering mengenai nasofaring dan disertai dengan sekret hidung purulen.

Streptokokus β -hemolitik non grup A (misalnya, grup B, C, dan G) merupakan penyebab faringitis bakteri yang tidak umum dan harus dilaporkan bila terdeteksi. Infeksi faring oleh *S. pyogenes* jika tidak diobati dengan benar, mungkin menyebabkan sekuele seperti demam rematik, dan lebih jarang, glomerulonefritis. Identifikasi spesifik dan pemberian antibakteri yang ditujukan langsung pada *S. pyogenes* terutama dimaksudkan untuk mencegah terjadinya demam rematik.

Corynebacterium diphtheriae adalah penyebab difteri, suatu penyakit yang endemik di banyak negara. Difteri dapat mencapai tingkatan epidemik di negara-negara yang program vaksinasinya terputus. *C. diphtheriae* menimbulkan bentuk infeksi khas (dengan sedikit pengecualian), yang ditandai oleh membran putih keabuan pada lokasi infeksi (faring, tonsil, hidung, atau laring). Difteri adalah penyakit yang serius dan diagnosis ditegakkan berdasarkan temuan klinis. Dokter biasanya akan mengajukan permintaan khusus untuk biakan basil difteri.

Faringitis gonokokal telah ditemukan dalam jumlah yang makin meningkat di beberapa negara, dengan frekuensi yang setara dengan gonore serviks dan uretra. Biakan usap tenggorok untuk gonokokus harus dikerjakan berdasarkan permintaan khusus dari klinisi, dengan menggunakan media selektif yang sesuai (media Thayer-Martin yang dimodifikasi).

Faringitis ulseratif nekrotikans (angina Vincent) adalah suatu keadaan langka yang ditandai oleh ulserasi nekrotik faring dengan atau tanpa pembentukan pseudomembran. Keadaan ini disertai, di tempat infeksi, oleh flora campuran obligat anaerob yang didominasi oleh batang fusiformis Gram negatif dan spirochaeta, biasanya disebut *Fusobacterium* spp. dan *Treponema vincentii*, dan mungkin bakteri lain. Walaupun kedua spesies tersebut merupakan flora normal mulut, keberadaannya dalam jumlah banyak pada apusan lesi ulkus yang dipulas Gram harus dilaporkan sebagai “kompleks fuso-spirochaeta”. Diagnosis mikroskopik ini tidak perlu dikonfirmasi dengan biakan anaerob, yang sulit dan memakan waktu. Walaupun demikian, keberadaan kompleks ini tidak meniadakan perlunya mencari patogen lain, khususnya *S. pyogenes*.

Walaupun sejumlah kecil *C. albicans* dan spesies *Candida* lain mungkin merupakan bagian dari flora normal mulut, kandidiasis oral terjadi bila jumlah organisme tersebut meningkat pada keadaan-keadaan patologis tertentu, misalnya, pada bayi prematur yang kurang gizi, orang dewasa yang imunodefisien (misalnya, pasien dengan HIV/AIDS) atau pasien yang mendapat antimikroba spektrum luas atau terapi kanker. Daerah yang terkena—lidah, tonsil, tenggorok, atau mukosa pipi—mungkin sangat merah, atau tertutup bercak putih atau membran putih kelabu yang meluas (*thrush*). Diagnosis kandidiasis paling baik dibuat dengan menemukan banyak sel ragi, beberapa di antaranya membentuk filamen panjang seperti miselium pada apusan eksudat yang dipulas Gram.

Apusan yang berasal dari saluran napas atas mungkin dikirim ke laboratorium bukan untuk diagnosis infeksi klinis tetapi untuk mendeteksi patogen potensial pada subjek sehat, seorang “karier (*carrier*)” faringeal atau nasal. Ini hanya boleh dilakukan sebagai bagian dari survei epidemiologis yang jelas. Patogen-patogen berikut ini dapat menyebabkan keadaan karier pada saluran napas atas:

- *Staphylococcus aureus*. Pengambilan sampel pasien dan staf untuk mencari karier nasal terkadang dilakukan sebagai bagian dari penyelidikan pada wabah *S. aureus* resisten metisilin (MRSA) di rumah sakit.
- *Neisseria meningitidis*. Karier meningokok mungkin sangat sering ditemukan (20% atau lebih) bahkan pada waktu-waktu non-epidemik. Identifikasi karier meningokok di faring jarang diper-

lukan dan tidak perlu dilakukan sebelum pemberian antibiotik profilaksis pada keluarga atau orang yang berkontak dengan pasien penderita penyakit meningokok.

- *Streptococcus pyogenes*. Pembawa organisme ini dalam jumlah sedikit mungkin sering ditemukan, khususnya pada anak sekolah (20–30%).
- *Corynebacterium diphtheriae*. Tingkat pembawa basil difteri tinggi pada populasi yang belum divaksinasi. Pada komunitas tersebut, mungkin dibenarkan untuk mengidentifikasi dan mengobati karier di antara orang-orang yang berkontak erat dengan pasien yang terbukti menderita difteri. Karier jarang ditemukan bila program imunisasi diterapkan dengan benar.

Pengambilan dan pengiriman spesimen

Idealnya, spesimen harus diambil oleh dokter atau personel yang terlatih. Pasien harus duduk menghadap sumber cahaya. Sambil lidah ditekan dengan spatula, sebuah lidi kapas steril diusapkan dengan kuat pada tiap tonsil, melalui dinding belakang faring dan semua tempat yang meradang. Hati-hati jangan sampai menyentuh lidah atau permukaan pipi bagian dalam (bukal). Sebaiknya mengambil dua usapan dari daerah yang sama. Usapan yang satu dapat digunakan untuk membuat sediaan apus, sedangkan usapan yang lain dimasukkan ke dalam wadah kaca atau plastik dan dikirim ke laboratorium. Alternatif lainnya adalah menempatkan kedua usapan dalam suatu wadah dan mengirimkannya ke laboratorium. Jika spesimen tidak dapat diproses dalam 4 jam, usapan harus dimasukkan dalam media transpor (misalnya, Amies atau Stuart).

Pemeriksaan mikroskopi langsung

Kompleks fusospirochaeta pada faringitis ulseratif nekrotikans (angina Vincent) dan *Candida* paling baik dikenali pada sediaan apus yang dipulas Gram, yang harus dibuat bila dokter membuat permintaan khusus. Sediaan pulasan Gram tersebut tidak berguna untuk mendeteksi streptokok atau *Neisseria* spp. Lagipula, sediaan apus langsung mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang rendah untuk deteksi basil difteri, kecuali bila spesimen sudah diambil dengan hati-hati dan diperiksa oleh ahli mikrobiologi yang berpengalaman. Tanpa adanya permintaan dokter atau keterangan klinis, apusan pulasan Gram tidak boleh dibuat untuk usapan tenggorok.

Biakan dan identifikasi

Biakan untuk *Streptococcus pyogenes*

Segara setelah diterima di laboratorium, lidi kapas harus digosokkan pada seperempat bagian lempeng agar darah, dan sisa lempeng digurat dengan sengkeli kawat yang steril. Agar darah harus dibuat dari media agar dasar tanpa glukosa (atau dengan kandungan glukosa yang rendah), misalnya, *tryptic soy agar* (TSA). Pengasaman glukosa oleh *S. pyogenes* menghambat produksi hemolisin. Darah dari semua spesies, bahkan darah manusia (darah donor segar) dapat digunakan dengan konsentrasi 5%. Cawan petri harus diisi sampai kedalaman 4–5 mm. Darah domba lebih disukai karena menunjukkan hemolisis pada beberapa kuman komensal *Haemophilus* spp. dan tidak menunjukkan hemolisis oleh *Enterococcus faecalis* varian *zymogenes*.

Koloni β -hemolitik lebih mudah dikenali dan identifikasi presumtifnya dapat dipercepat dengan menempatkan cakram kotrimoksazol (seperti yang digunakan pada uji kepekaan) dan cakram basitrasin konsentrasi rendah khusus pada daerah guratan awal. Karena *S. pyogenes* bersifat resisten terhadap kotrimoksazol, sedangkan banyak bakteri lain sensitif terhadapnya, cakram kotrimoksazol menyebabkan hemolisis β tampak lebih jelas. Inkubasi dalam botol lilin akan mendeteksi sebagian besar streptokokus β -hemolitik. Cara mudah untuk meningkatkan hemolisis adalah dengan menusuk permukaan agar secara tegak lurus dengan memasukkan sengkeli ke dalam media untuk meningkatkan pertumbuhan koloni yang berada di bawah permukaan. Setelah diinkubasi selama 18 jam, dan kemudian 48 jam pada suhu 35–37° C. Agar darah harus diperiksa untuk melihat adanya koloni-koloni kecil (0,5–2 mm) yang dikelilingi oleh zona hemolisis jernih yang relatif lebar. Setelah

melakukan pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa kuman adalah kokus Gram-positif, koloni kuman tersebut harus menjalani uji identifikasi spesifik untuk *S. pyogenes*. Untuk tujuan klinis, identifikasi presumtif *S. pyogenes* didasarkan pada kepekaannya terhadap basitrasin konsentrasi rendah. Untuk itu, digunakan suatu cakram diferensial khusus yang mengandung 0,02–0,05 IU basitrasin. Cakram yang biasa digunakan untuk uji kepekaan, yang mengandung 10 unit, tidak cocok untuk identifikasi ini. Streptokokus β -hemolitik yang menunjukkan zona inhibisi di sekeliling cakram harus dilaporkan sebagai *S. pyogenes*. Jika koloni hemolitik cukup banyak, ada tidaknya zona inhibisi dapat dibaca langsung dari agar darah primer. Jika koloninya kurang banyak, satu atau dua koloni harus diambil dari agar primer, diguratkan pada seperlima bagian lempeng agar darah baru untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, dan masing-masing daerah yang telah diinokulasi ditutup dengan satu cakram basitrasin. Setelah inkubasi semalaman, subkultur harus dibaca untuk melihat zona inhibisi.

Di beberapa laboratorium, identifikasi presumtif dipastikan dengan uji serologis yang menunjukkan polisakarida dinding sel yang spesifik. Ini dapat dilakukan dengan metode presipitin klasik, atau lebih cepat menggunakan peralatan komersial (*commercial kit*) untuk uji koaglutinasi kaca objek cepat (*rapid slide coagglutination*) atau uji aglutinasi lateks. Jika diinginkan, streptokokus β -hemolitik yang resisten terhadap basitrasin dapat diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan beberapa uji fisiologis sederhana (lihat Tabel 19). Mungkin ditemukan koloni-koloni kecil (*minute*) streptokokus β -hemolitik yang jika tumbuh dan dikelompokkan secara serologis bereaksi dengan antiserum grup A. Streptokokus ini tidak dianggap sebagai *S. pyogenes* dan tidak terkait dengan infeksi-infeksi berat yang disebabkan oleh streptokokus grup A.

Dalam melaporkan keberadaan *S. pyogenes* pada biakan tenggorok, harus diberikan jawaban semikuantitatif (jarang, +, ++, atau +++). Pasien-pasien dengan faringitis karena streptokokus biasanya menunjukkan pertumbuhan *S. pyogenes* yang hebat dengan koloni yang menutupi seluruh permukaan lempeng. Lempeng agar untuk karier biasanya menunjukkan kurang dari 20 koloni per lempeng. Koloni streptokokus β -hemolitikus yang jarang sekalipun harus dipastikan dan dilaporkan.

Tabel 19. Diferensiasi streptokokus β -hemolitikus

Spesies	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i> ^a	Lainnya
Grup Lancefield	A	B	D	C, G, F
Hemolisis	β	β^b	β	β
Zona di sekeliling cakram basitrasin diferensial	+	0 ^c	0 ^c	0 ^d
Agar bile-aesculin (tumbuh dan menghitam)	0	0	+	0
Uji CAMP terbalik	0	+	0	0
Kepekaan Ko-trimoksazol ^e	0	0	0	+
Uji PYR ^f	+	0	+	0

^a*E. faecalis* var. *zymogenes* menghasilkan hemolisis- β hanya pada agar darah kuda.

^b5% non-hemolitik.

^c5% positif.

^d10% positif.

^eCakram yang sama dengan metode Kirby-Bauer.

^fPYR: pyrrolidonyl- β -naphthylamide.

Biakan untuk *Corynebacterium diptheriae*

Walaupun basil difteri tumbuh baik pada agar darah biasa, pertumbuhannya lebih baik dengan melakukan inokulasi pada salah satu atau dua media khusus:

- *Loeffler coagulated serum* atau *Dorset egg medium*. Walaupun tidak selektif, kedua media tersebut menghasilkan pertumbuhan basil difteri yang berlimpah setelah inkubasi semalaman. Lagipula, morfologi selular basil ini lebih “khas”: batang yang agak bengkok, berwarna tidak beraturan, pendek sampai panjang, menunjukkan granula metakromatik, dan tersusun dalam bentuk V atau palisade sejajar. Granula metakromatik lebih jelas setelah diwarnai dengan biru metilen atau pulasan Albert daripada dengan pulasan Gram.
- *Agar darah telurit yang selektif*. Media ini memudahkan isolasi saat bakteri berjumlah sedikit, misalnya pada kasus karier yang sehat. Pada media ini, koloni basil difteri berwarna keabu-abuan sampai hitam dan berkembang sempurna hanya setelah 48 jam. Koloni mencurigakan, yang mengandung basil dengan morfologi *coryneform* pada pulasan Gram, harus disubkultur pada lempeng agar darah untuk memeriksa kemurniannya dan keberadaan morfologi yang “khas”. Harus diingat pula bahwa koloni *C. diptheriae* biotipe *mitis*, yang paling banyak ditemukan, menunjukkan zona hemolisis- β yang jelas pada agar darah.

Suatu laporan dugaan adanya *C. diptheriae* seringkali dapat diberikan pada tahap ini. Walaupun demikian, ini harus dipastikan atau disingkirkan dengan beberapa uji biokimia sederhana dan dengan menunjukkan adanya toksigenesitas. Karena uji toksigenesitas mensyaratkan inokulasi pada kelinci percobaan atau suatu uji toksigenik *in vitro* (Elek), dan harus dilakukan di laboratorium pusat, hanya identifikasi biokimia cepat yang akan dibahas di sini. *C. diptheriae* bersifat katalase positif dan nitrat positif. Urea tidak dihidrolisis. Asam tanpa gas dihasilkan dari glukosa dan maltosa, umumnya tidak dari sakarosa. Fermentasi glukosa dapat diuji pada media Kligler. Aktivitas urease dapat ditunjukkan pada MIU dan reduksi nitrat pada kaldu nitrat seperti pada Enterobacteriaceae. Untuk fermentasi maltose dan sakarose, air pepton Andrade dapat digunakan sebagai pelarut dengan konsentrasi akhir 1% untuk tiap karbohidrat. Hasil biasanya dapat dibaca setelah 24 jam walaupun kemungkinan perlu diinkubasi lagi semalaman. Harus ditekankan bahwa peran laboratorium mikrobiologi adalah untuk memastikan diagnosis klinis difteri. Terapi tidak boleh ditunda karena menunggu hasil laboratorium. Keterangan yang lebih rinci mengenai isolasi dan identifikasi *C. diptheriae* ada pada buku *Guidelines for the laboratory diagnosis of diptheria*.¹

Uji kepekaan

Uji kepekaan rutin pada isolat tenggorok atau faring sering tidak diperlukan dan bahkan mungkin menyesatkan. Patogen-patogen utama yang terlibat pada faringitis bakteri adalah *S. pyogenes* dan *C. diptheriae*. Bensilpenisilin dan eritromisin dianggap sebagai antimikroba pilihan untuk mengobati kedua jenis infeksi tersebut. Pada kasus difteri, juga diindikasikan pengobatan dengan antitoksin.

¹ Begg N. Manual for the management and control of diptheria in the European region. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 1994.

Infeksi saluran napas bawah

Pendahuluan

Infeksi saluran napas bawah (ISPB) adalah infeksi yang terjadi di bawah laring, yakni di trakea, bronkus atau jaringan paru (trakeitis, bronkitis, abses paru, pneumonia). Pada pneumonia, membran sekitar yang menyelubungi paru kadang-kadang juga terkena, menyebabkan pleuritis dan kadang-kadang produksi cairan di rongga pleura (efusi pleura).

Bentuk ISPB yang khusus adalah tuberkulosis paru, yang banyak ditemukan di banyak negara. Pasien mungkin membatukkan aerosol yang mengandung basil tuberkulosis (*Mycobacterium tuberculosis*) yang dapat terhirup oleh orang lain. Penyakit semacam ini (tuberkulosis “terbuka”) menular dari orang ke orang dengan mudah sehingga merupakan penyakit menular yang serius.

Banyak pasien dengan ISPB membatukkan dahak purulen (mengandung pus) yang umumnya berwarna hijau atau kekuningan; dahak ini dapat dibiakkan dan diperiksa secara makroskopik dan mikroskopik.

Terdapat pula infeksi lain yang tidak atau hanya sedikit menghasilkan dahak: penyakit Legionnaire (disebabkan oleh *Legionella pneumophila*), pneumonia akibat *Mycoplasma pneumoniae* (“pneumonia atipik primer”), dan pneumonia *Chlamydia*. Penyakit-penyakit ini memerlukan teknik khusus (serologik dan isolasi pada biakan khusus) untuk diagnosisnya dan tidak akan dibahas lebih lanjut di sini. Selain tuberkulosis paru (lihat di bawah), sebagian besar permintaan untuk pemeriksaan mikroskopik dan biakan dahak berkenaan dengan pasien pengidap infeksi pernapasan yang disertai dahak purulen.

Infeksi-infeksi tersering

Bronkitis akut dan kronik

Pada pasien-pasien dengan *bronkitis akut* (biasanya setelah infeksi virus akut, seperti pilek atau influenza), dahak biasanya tidak dibiakkan, kecuali jika pasien tidak menunjukkan tanda-tanda perbaikan klinis.

Bronkitis kronik adalah penyakit pernapasan yang berlangsung lama dan menyebabkan disabilitas dengan serangan-serangan akut yang periodik. Sebagian besar pasien biasanya membatukkan dahak setiap hari, yang biasanya berwarna kelabu dan mukoid; penyakit ini juga bermanifestasi saat kondisi pasien memburuk dan tentunya menghasilkan dahak purulen. Ini disebut eksaserbasi akut bronkitis kronik. Patogen pernapasan yang khas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, atau yang lebih jarang *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*) sering ditemukan dalam sampel dahak.

Abses paru

Abses dapat terbentuk dalam paru setelah inhalasi benda asing, isi lambung, atau sekret saluran napas atas (mulut atau tenggorok). Ini kadang-kadang disebut “pneumonia aspirasi”. Dapat dicoba untuk membiakkan dahak yang dibatukkan (yang biasanya berbau busuk), tetapi jika ada abses (seperti tampak pada radiografi), pus yang terkandung dalam abses harus diperiksa secara mikroskopik dan dibiakkan. Sayangnya, tidak ada kesepakatan medis mengenai cara pengambilan pus ini, tetapi pungsi langsung dan penyedotan pus merupakan salah satu kemungkinan cara. Bakteri anaerob seperti *Prevotella melaninogenica* (dulu disebut *Bacteroides melaninogenicus*) dan *Peptostreptococcus* spp., yang berkembang sebagai flora mulut atau tenggorok, sering menjadi agen penyebab

utama. Pus harus dikumpulkan, dikirim, dan diperiksa sesuai metode baku untuk biakan anerob pus (lihat hal. 99 dan hal 113–118).

Pneumonia dan bronkopneumonia

Pneumonia lobaris akut biasanya hanya mengenai satu lobus paru. Infeksi ini hampir selalu disebabkan oleh *S. pneumoniae*. Bentuk pneumonia ini kadang ditemukan dalam bentuk epidemi. Penyebab yang jarang untuk bentuk pneumonia yang relatif serupa adalah *Klebsiella pneumoniae*.

Walaupun beberapa pasien yang terinfeksi oleh *S. pneumoniae* atau *K. pneumoniae* akan menderita pneumonia klasik, bentuk penyakit yang paling sering adalah *bronkopneumonia*, dengan bercak-bercak infiltrat dan peradangan (disebut “konsolidasi”) yang tersebar pada salah satu atau seringnya kedua paru.

Berbagai jenis virus atau bakteri dapat menyebabkan bronkopneumonia. Selain *S. pneumoniae*, dan kadang *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab bronkopneumonia, khususnya selama epidemi influenza atau campak. Batang Gram-negatif (khususnya *E. coli* dan *K. pneumoniae*) dan *P. aeruginosa* juga sering ditemukan. Semua infeksi ini sering ditemukan di bagian perawatan intensif, terutama jika banyak dipakai antibiotika spektrum luas atau digunakan respirasi mekanik. Ini juga menunjukkan penggunaan antibiotik yang sembarangan serta gagalnya pemantauan tanda-tanda awal infeksi pada pasien.

Jika terdapat efusi pleura, cairan pleura harus diperiksa secara mikroskopik dan dibiakkan menurut prosedur yang dijelaskan untuk pus dan eksudat.

Tuberkulosis paru

Dahak pasien dengan tuberkulosis paru biasanya tidak terlalu purulen, tetapi pemeriksaan tuberkulosis harus dilakukan jika dahak purulen. Sediaan apus pewarnaan tahan asam harus diperiksa secara mikroskopik untuk segera mendeteksi pasien yang mengandung bakteri tahan asam dalam dahaknya.¹ Setelah sediaan apus diwarnai, dahak harus ditangani sesuai prosedur dekontaminasi (lihat hal. 67) untuk membunuh organisme bukan mikobakterium sebanyak mungkin dan membiarkan basil tuberkulosis hidup sehingga dahak cocok untuk dibiakkan pada media Löwenstein-Jensen.

Prosedur biologis untuk diagnosis infeksi saluran napas piogenik, seperti bronkitis dan pneumonia, secara mendasar sangat berbeda dibandingkan dengan tuberkulosis maka akan dibahas secara terpisah. Dokter harus menyatakan kepada laboratorium dengan jelas apakah ia menginginkan pemeriksaan untuk:

- bakteri piogenik (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, dll.),
- Bakteri tuberkulosis (*M. tuberculosis*), atau
- keduanya.

Pengumpulan spesimen dahak

Pengumpulan spesimen dahak yang baik adalah sebuah seni tersendiri dan telah dibahas dalam buku-buku lain.² Pemeriksaan spesimen dahak yang tidak diambil dengan baik dapat memberi hasil yang menyesatkan karena terkontaminasi dengan flora bakteri normal yang terdapat dalam mulut dan tenggorok; “dahak” yang terdiri dari air liur dan partikel makanan jangan diperiksa.

¹ Lihat Manual of basic techniques for a health laboratory, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2003.

² Specimen collection and transport for microbiological investigation. Alexandria, WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, 1995 (WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series 8).

Manual of basic techniques for a health laboratory, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2003.

Technical guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy. Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 4th ed. 1996.

Dahak harus dikumpulkan dalam wadah steril bermulut lebar dengan tutup yang kuat dan rapat dan segera dikirim ke laboratorium. Jika dahak dibiarkan setelah pengumpulan, mungkin terjadi pertumbuhan berlebih bakteri kontaminan sebelum pemeriksaan dilakukan dan hasil pemeriksaan sediaan apus dan biakan akan sangat menyesatkan. Oleh karena itu, tidak disarankan mengirim bahan dahak melalui pos. Pengecualian bagi spesimen pemeriksaan tuberkulosis yang mungkin harus dikirim ke laboratorium daerah atau regional. Peraturan pos lokal dan regional untuk pengiriman bahan terinfeksi (patologis) harus dijalankan dengan ketat.

Pengerjaan dahak dalam laboratorium (untuk infeksi non-tuberkulosis)

Setelah pengumpulan, dahak harus segera dikerjakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

Pemeriksaan makroskopik

Penampakan makroskopik dahak harus dicatat. Kemungkinan deskripsinya meliputi:

purulen, hijau
 purulen, kuning
 mukopurulen (misalnya, sebagian mukoid dan sebagian purulen)
 berbercak darah
 berbercak darah, dengan flokulasi hijau
 *kelabu, mukoid
 *kelabu, berbusa
 *putih, mukoid
 *putih, berbusa
 *putih, mukoid, dengan beberapa partikel makanan
 *cair (yaitu hanya terdapat air liur)
 *cair, dengan beberapa partikel makanan

Spesimen dahak dengan karakteristik yang ditandai dengan bintang (*asterisk*) biasanya tidak dilakukan pemeriksaan infeksi non-tuberkulosis.

Pemeriksaan mikroskopik

Bagian dahak yang purulen atau mukopurulen harus digunakan dalam pembuatan sediaan apus pulasan Gram.

Jika tidak ada flokulasi pus yang tampak (misalnya, dalam sampel dahak mukoid kelabu), sediaan apus mungkin hanya menunjukkan adanya sel-sel epitel gepeng besar dan berbentuk agak persegi, yang sering tertutup massa bakteri yang melekat. Ini adalah petunjuk bahwa bahan tersebut terutama terdiri dari sekret mulut dan tenggorok; dan biakan semacam ini tidak boleh dikerjakan karena tidak relevan dan biasanya sangat menyesatkan. Pedoman yang disetujui adalah menolak semua spesimen untuk biakan yang mengandung kurang dari 10 neutrofil polimorfonuklear per sel epitel.¹

Pada banyak pasien dengan infeksi saluran napas akut (misalnya, pneumonia) dan dahak purulen, pemeriksaan darurat sediaan apus pulasan Gram dapat memberi petunjuk kepada klinisi dalam pemilihan kemoterapi antimikroba. Hasil yang mungkin mencakup:

- diplokokus Gram-positif yang dikelilingi rongga kosong kapsul yang tidak berwarna (sugestif untuk *S. pneumoniae*);

¹ Heinemann HS & Radano RR. Acceptability and cost savings of selective sputum microbiology in a community teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 10: 567-573.

- kokobasil Gram-negatif kecil (kemungkinan *H. influenzae*);
- diplokokus Gram-negatif, intraselular dan ekstraselular (sugestif untuk *Moraxella catarrhalis*);
- kokus Gram-positif dalam kelompok mirip anggur (sugestif untuk *S. aureus*);
- batang Gram-negatif (sugestif untuk *Enterobacteriaceae* atau *Pseudomonas* spp.);
- sel-sel Gram-positif besar mirip ragi, seringkali dengan miselium (sugestif untuk *Candida* spp.).

Prosedur biakan dan penafsirannya

Jika mikroskopik spesimen menunjukkan mutu dahak yang dapat diterima, pilihlah satu flokulasi bahan yang purulen (atau bahan paling mendekati purulen yang ada) menggunakan lidi kapas atau sengkeli steril dan inokulasikan pada berbagai lempeng agar biakan.

Rangkaian media biakan rutin yang dianjurkan adalah sebagai berikut.

- agar darah, dengan guratan *S. aureus* untuk memfasilitasi pertumbuhan satelit *H. influenzae*, dan dengan cakram optochin yang ditempatkan di tengah guratan kedua,
- agar coklat,
- agar MacConkey.

Lempeng agar darah dan agar coklat diinkubasi pada 35–36° C dalam udara yang mengandung karbon dioksida berlebih (misalnya, dalam stoples lilin); agar MacConkey diinkubasi pada udara biasa.

Jika terdapat kokus Gram-positif yang berkelompok, seperti anggur pada sediaan apus, disarankan untuk menambah satu media *mannitol salt agar* (MSA). Adanya struktur mirip ragi dengan Gram-positif pada sediaan apus mungkin merupakan indikasi dilakukannya inokulasi tabung agar dekstrosa Sabouraud (yang harus diinkubasi sedikitnya 3 hari pada suhu 35–37° C). Biakan MSA dan Sabouraud tidak perlu dikerjakan secara rutin untuk semua spesimen dahak.

Biakan harus diamati setelah inkubasi semalaman (18 jam), tetapi rcinkubasi tambahan selama 24 jam diindikasikan jika pada pemeriksaan mikroskopik, pertumbuhannya kurang dari perkiraan, atau jika hanya terdapat koloni-koloni kecil.

Temuan yang khas mencakup:

- Koloni datar jernih dengan pusat yang cekung dan zona hemolisis (α) hijau, serta zona hambatan pertumbuhan di sekeliling cakram optochin, mungkin adalah *S. pneumoniae*. Jika pembacaan hasil uji optochin pada agar primer tidak dapat disimpulkan, uji harus diulang pada subkultur. Jangan lupa bahwa koloni hemolitik- α lain (yang dinamakan *S. viridans*) pada keadaan normal ditemukan dalam flora mulut dan tenggorok.
- Koloni-koloni kecil seperti tetesan air tumbuh sebagai koloni-koloni satelit non-hemolitik pada lempeng agar darah, tetapi koloni jernih yang jauh lebih besar pada agar coklat atau agar darah yang diperkaya, mengarah pada keberadaan *H. influenzae*. Koloni-koloni tersebut biasanya ditemukan dalam jumlah banyak, umumnya lebih dari 20 koloni per lempeng agar. Beberapa laboratorium memilih untuk memastikan *H. influenzae* dengan uji ketergantungan pada faktor X dan V, tetapi uji tersebut harus dikendalikan dengan sangat hati-hati dan tidak mutlak diperlukan. Penentuan galur saluran napas secara serologis biasanya tidak membantu karena sebagian besar galur “kasar” dan tidak dapat ditentukan tipenya.
- Koloni kelabu-putih rapuh dan kering pada agar darah dan agar coklat yang dapat diangkat secara utuh dengan sengkeli mungkin menunjukkan *M. catarrhalis*. Jika diinginkan, serangkaian uji pemecahan gula dapat dikerjakan (semua hasil uji negatif), tetapi kebanyakan laboratorium tidak melaksanakannya. Organisme *Moraxella* sangat oksidase positif, dan penampilan koloni dan mikroskopiknya sangat khas. Oleh karena tampilan morfologinya menyerupai *Neisseria* spp., uji tributirin dapat digunakan untuk membedakan karena *Moraxella* menghidrolisis tributirin.

- Koloni kuning keemasan berukuran sedang dibentuk oleh *S. aureus*. Uji koagulasi dan fermentasi manitol positif walaupun uji koagulasi kaca obyek (uji koagulase “terikat”) kadang negatif. Jika terdapat ketidaksesuaian antara penampakan koloni dengan uji kaca obyek, harus dikerjakan uji koagulase tabung (koagulase “bebas”).
- Koloni pada agar MacConkey menunjukkan adanya Enterobacteriaceae atau *Pseudomonas* spp. atau *Acinetobacter* spp.
- Koloni keputihan, bundar, dan tidak mengkilap pada agar darah dan agar coklat kemungkinan adalah *Candida albicans*, yang juga tumbuh pada biakan agar dekstrosa Sabaouraud dalam 2–3 hari.

Perlu ditekankan bahwa koloni yang jarang ditemukan dari salah satu organisme di atas dapat berasal dari flora komensal normal pada saluran napas atau merupakan hasil kolonisasi (misalnya, koliform, ragi). Karena dapat tidak relevan dengan penatalaksanaan pasien, organisme tersebut jangan dilaporkan, atau dilaporkan sebagai flora yang berkolonisasi.

Uji kepekaan

Uji kepekaan harus dilakukan hanya bila jumlah pertumbuhan dianggap bermakna, dan tidak pada semua spesies bakteri yang terdapat dalam jumlah kecil pada biakan. Interpretasi beberapa hasil yang mungkin disajikan dalam Tabel 20.

Untuk Enterobacteriaceae dan stafilocokus, harus digunakan metode difusi cakram yang baku (Kirby-Bauer). Galur-galur *S. pneumoniae* harus diuji pada agar Mueller-Hinton yang diberi suplementasi darah domba 5% untuk uji kepekaan terhadap tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin dan bensilpenisilin. Agar darah konvensional juga dapat digunakan. Untuk bensilpenisilin, cakram yang mengandung 1 µg oksasilin lebih disukai dibandingkan dengan cakram yang mengandung bensilpenisilin itu sendiri karena hasil dengan oksasilin ini lebih sesuai dengan nilai KHM (konsentrasi hambatan minimal) bensilpenisilin; juga lebih stabil. Cakram bensilpenisilin dapat rusak dengan cepat pada cuaca panas dan karenanya memberi hasil yang tidak dapat diandalkan.

Tabel 20. Interpretasi uji kepekaan organisme yang sulit tumbuh (*fastidious*)^a

	Diameter zona total (mm)		
	Resisten	Intermediet	Sensitif
<i>S. pneumoniae</i> (Mueller-Hinton dengan darah domba 5%, inkubasi dalam CO ₂ 5%)			
Oxacillin (1 µg) (untuk bensilpenisilin)	≤19 ^b	–	≥20
Tetrasiklin (30 µg)	≤18	19-22	≥22
Eritromisin (15 µg)	≤15	16-20	≥21
Kloramfenikol (30 µg)	≤20	–	≥21
Kotrimoksazol (25 µg)	≤15	16-18	≥19
<i>M. catarrhalis</i> (Mueller-Hinton)			
Tetrasiklin (30 µg)	≤14	15-18	≥19
Eritromisin (15 µg)	≤13	14-22	≥23
Kotrimoksazol (25 µg)	≤10	11-15	≥16

^a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. M100-S8. Vol 18, 1998.

^b Resisten atau intermediet.

Galur-galur *H. influenzae* harus diuji untuk melihat produksi β -laktamase, misalnya menggunakan uji Nitrocefin. Galur *H. influenzae* yang langka mungkin bersifat resisten terhadap ampicilin tanpa menghasilkan β -laktamase. Pada tahap ini, tidak disarankan untuk menguji kepekaan antibiotik pada *H. influenzae* dengan teknik difusi cakram.

Isolat *M. catarrhalis* harus diuji untuk melihat produksi β -laktamase. Uji terhadap tetrasetiklin dan eritromisin bersifat pilihan.

Biakan *Candida albicans* tidak perlu diuji terhadap obat antimikroba.

Kebanyakan laboratorium memberikan penilaian semikuantitatif untuk bakteri yang dibiakkan pada media padat, yang dapat disajikan sebagai berikut:

- (+) = sedikit koloni
- ++ = pertumbuhan ringan
- +++ = pertumbuhan sedang
- ++++ = pertumbuhan banyak.

Biakan untuk *Mycobacterium tuberculosis*

Selain untuk pembuatan sediaan apus langsung yang dipulas tahan asam, spesimen (biasanya dahak, tetapi tidak selalu) harus dibiakkan untuk *M. tuberculosis*, kapanpun terdapat kecurigaan secara klinis. Beberapa pasien, yang dicurigai menderita tuberkulosis paru, mungkin saja tidak membatukkan dahak sama sekali. Sebenarnya, mungkin ada sedikit dahak yang dihasilkan, tetapi segera tertelan. Pada kasus demikian, dokter harus mengambil spesimen berupa getah lambung puasa (biasanya diambil pagi-pagi sekali) dan menetralkan spesimen dengan natrium bikarbonat (100 mg) sebelum mengirimnya ke laboratorium. Getah lambung harus diperlakukan sama dengan dahak. Pemiakan seluruh bahan dahak untuk menemukan basil tuberkulosis jangan dijadikan pemeriksaan rutin (walaupun mungkin terdeteksi beberapa pasien yang sebelumnya tidak dicurigai) sebab menghabiskan biaya yang besar.

Prosedur pemekatan-digesti-dekontaminasi

Dahak pasien dengan infeksi tuberkulosis sering mengandung partikel padat dari materi yang berasal dari paru dan jika ada materi ini harus diseleksi untuk biakan. Walaupun demikian, karena dahak tuberkulosis dibatukkan melalui tenggorok dan mulut, pencemaran oleh flora normal faring tidak dapat dihindarkan. Bakteri pencemar harus dibinasakan agar tidak terjadi pertumbuhan berlebihan pada media biakan Löwenstein-Jensen. Oleh karena itu, dianjurkan untuk melakukan prosedur pemekatan-digesti-dekontaminasi pada semua bahan yang diambil dari tempat yang mengandung flora normal. Tiga prosedur berikut ini banyak digunakan:

- Natrium hidroksida (NaOH) (Petroff);
- N-acetyl-L-cysteine-Natrium hidroksida (NALC-NaOH); dan
- Zephiran-trisodium fosfat

Prosedur Natrium hidroksida (Petroff)

Prosedur ini mencairkan dahak yang kadang-kadang mukoid sambil menghancurkan organisme pencemar. Walaupun demikian, natrium hidroksida juga toksik terhadap mikobakteria. Jadi, penggunaan metode ini harus berhati-hati dan dipastikan:

- konsentrasi akhir NaOH tidak melebihi 2%;
- basil tuberkulosis tidak terpajan natrium hidroksida lebih dari 30 menit, termasuk waktu sentrifugasi.

1. Campurlah dahak dengan natrium hidroksida 4%, 40g/l (yang telah disterilkan dengan otoklaf) dalam jumlah yang sama di dalam botol atau stoples kaca berukuran 50 ml yang steril dan anti-bocor, atau tabung sentrifus plastik berbentuk kerucut.
2. Inkubasi pada suhu ruang (25–30° C) selama 15 menit, goyangkan campuran tersebut dengan hati-hati setiap 5 menit menggunakan penggoyang mekanik. Pada cuaca panas, mungkin diperlukan pendinginan atau waktu reaksi dikurangi menjadi 10–15 menit.
3. Sentrifus segera atau encerkan campuran sampai tanda 50 ml dengan air suling atau dapar fosfat (pH 6,8) untuk menghentikan kerja NaOH.
4. Setelah 15 menit, sentrifus bahan dengan kecepatan 3000 g selama 15 menit. Buang supernatan dengan hati-hati ke dalam wadah *splash-proof* yang diisi dengan desinfektan yang sesuai (berbasis fenol atau glutaraldehid). Netralkan sedimen dengan larutan HCl 2 mol/l yang mengandung *phenol red* 2% secara hati-hati, campur dengan cara menggoyangnya sampai warna berubah selamanya dari merah menjadi kuning. Cara lain adalah menambahkan satu tetes larutan indikator dan kemudian menambahkan HCl tetes demi tetes sambil menggoyangnya secara kontinu.
5. Jika media akan diinokulasi segera, suspensikan endapan yang telah dinetralkan tersebut dalam 1–2 ml NaCl 0,85% steril atau air suling steril. Kalau tidak, suspensikan sedimen dalam 1–2 ml fraksi V albumin sapi (*bovine*) steril.

Prosedur N-acetyl-L-cysteine-natrium hidroksida

Konsentrasi NaOH yang lebih rendah dengan adanya zat mukolitik seperti N-acetyl-L-cysteine (NALC) kurang agresif terhadap basil tuberkulosis. Waktu dan suhu inkubasinya tidak sepenting yang terdapat dalam prosedur NaOH. Walaupun demikian, waktu simpan larutan kerja NALC-NaOH yang tidak lebih dari 24 jam mengharuskan larutan ini dibuat tiap hari.

1. Campurkan larutan natrium sitrat (29 g natrium sitrat dihidrat per liter air suling) dan natrium hidroksida 4% (40 g/l) dalam jumlah yang sama, lalu autoklaf campuran tersebut.
2. Sesaat sebelum dipakai, tambahkan 0,5 g NALC ke dalam 100 ml larutan NaOH-natrium sitrat.
3. Tergantung jumlah bahan yang harus didekontaminasi, siapkan 2,5 g NALC dalam 500 ml larutan NaOH-natrium sitrat, atau 5 g NALC dalam 1000 ml larutan NaOH-natrium sitrat. Setelah 24 jam, reagen ini harus dibuang.
4. Tambahkan larutan kerja NALC-NaOH dalam jumlah yang sama dengan bahan ke dalam botol atau stoples kaca berukuran 50 ml yang steril dan anti-bocor, atau tabung sentrifus plastik berbentuk kerucut. Kencangkan tutup ulirnya dengan erat, balikkan tabung dan kocok perlahan selama tidak lebih dari 30 detik.
5. Biarkan tabung selama 15 menit pada suhu ruang (20–25° C).
6. Encerkan campuran sampai garis batas 50 ml dengan air suling atau dapar fosfat 67 mmol/l (pH 6,8) untuk menghentikan kerja NaOH. Buang supernatan dengan hati-hati ke dalam wadah *splash-proof* yang diisi dengan desinfektan yang sesuai (berbasis fenol atau glutaraldehid).
7. Jika media akan diinokulasi segera, suspensikan endapan dalam 1–2 ml NaCl 0,85% atau air suling steril. Kalau tidak, suspensikan sedimen dalam 1–2 ml fraksi V albumin sapi (*bovine*) steril.

Prosedur Zephiran-trisodium fosfat

Mikobakterium dapat bertahan terhadap perlakuan yang lebih lama prosedur yang lebih ringan ini. Oleh karena itu, waktu inkubasi dan suhu tidak terlalu penting.

1. Siapkan 1 kg trisodium fosfat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dalam 4 liter air suling panas, tambahkan 7,5 ml benzalkonium klorida 17% (Zephiran), campur baik-baik, dan simpan pada suhu ruang.
2. Campurlah dahak (sampai 10 ml) dengan larutan Zephiran-trisodium fosfat dalam jumlah yang sama di dalam botol kaca steril, anti-bocor untuk sentrifugasi berukuran 50 ml. Eratkan tutupnya dan kocok kuat secara manual atau dengan menggunakan pengguncang mekanik selama 30 menit.
3. Biarkan larutan selama 30 menit lagi.
4. Sentrifus dengan kecepatan 3000g selama 15 menit. Buang supernatan dengan hati-hati ke da-

lam wadah *splash-proof* yang diisi dengan desinfektan yang sesuai (berbasis fenol atau glutaraldehid) dan suspensikan kembali sedimen dalam 20 ml dapar fosfat yang menetralkan, pH 6,6.¹

5. Sentrifugasi sekali lagi dengan kecepatan 3000g selama 15 menit. Buang supernatan dan inokulasikan sedimen pada media.

Biakan

1. Inokulasikan 3 tetes (sekitar 0,1 ml) sedimen ke dalam sedikitnya tiga lempeng media Löwenstein-Jensen atau sebanding.
2. Tentukan derajat kontaminasi media secara teratur dan catat jumlah lempeng yang terkontaminasi.

Tingkat kontaminasi sebaiknya 3–5%. Kontaminasi berlebih (lebih dari 5%) biakan Löwenstein-Jensen biasanya menunjukkan bahwa prosedur dekontaminasinya tidak cukup efektif. Kontaminasi <3% menunjukkan bahwa prosedur dekontaminasi terlalu berlebihan dan mikobakteria pada sampel mungkin gagal tumbuh.

Interpretasi biakan untuk *M. tuberculosis*

Tabung-tabung yang mengandung media Löwenstein-Jensen harus diinkubasi selama 2–3 hari pada suhu 35–37° C dalam posisi mendatar, dengan tutup yang dilonggarkan setengah putaran. Tabung-tabung biakan kemudian harus disimpan pada suhu 37° C selama enam minggu dan diinspeksi untuk melihat pertumbuhan tiap minggu. Selama inspeksi mingguan ini, pertumbuhan koloni bakteri apapun pada permukaan harus dicatat. Sediaan hapus harus dibuat dengan hati-hati dan dipulas dengan prosedur Ziehl-Neelsen. Jika organismenya bukan basil tahan asam, biakan dapat dicatat sebagai terkontaminasi.

Galur *Mycobacterium tuberculosis* pada manusia yang khas bersifat “kasar, keras dan suram”, dan kadang dapat dilihat setelah inkubasi 2–3 minggu (tetapi jarang kurang dari itu). Galur pada sapi (*M. bovis*) umumnya licin dan berwarna krem keputihan. Spesies mikobakterium lain, yang umumnya tidak patogenik, dapat tumbuh lebih cepat (kadang-kadang hanya dalam beberapa hari) dan mungkin menghasilkan koloni berpigmen (merah, kuning, atau jingga). Jika suatu isolat mempunyai penampilan koloni yang khas dan sediaan apus pewarnaan Ziehl-Neelsen dari koloni juga khas, isolat harus dilaporkan sebagai “*Mycobacterium* spp., kemungkinan *M. tuberculosis*”; isolat tersebut juga harus dikirimkan ke laboratorium rujukan nasional atau lokal untuk identifikasi dan uji kepekaan karena prosedur-prosedur tersebut adalah prosedur yang sangat khusus.

Panduan umum untuk keamanan

Dahak harus selalu diperlakukan dengan hati-hati dan wadah spesimen taban bocor harus selalu digunakan, terutama bila harus menggunakan layanan pos. Disarankan semua prosedur yang melibatkan dahak (bahkan bila tuberkulosis tidak disebut pada lembar permintaan) dilakukan dalam kotak aman bakteriologis (*bacteriological safety box*). Bahkan kotak buatan sendiri lebih baik daripada tidak sama sekali. Laboratorium-laboratorium yang memproses spesimen yang diperkirakan mengandung mikrobakterium patogenik sangat disarankan untuk memenuhi sedikitnya persyaratan keselamatan biologis tingkat 2 (*biosafety level 2*).²

¹ Pembuatan dapar fosfat penetral 67 mmol/l.

Larutan stok:

A. Larutkan 9,47 g dinatrium fosfat anhidrosa dalam 1 liter air suling.

B. Larutkan 9,07 g monokalium fosfat anhidrosa dalam 1 liter air suling.

Untuk dapar pH 6,8: campurkan 50 ml larutan stok A dengan 50 ml larutan stok B.

Untuk dapar pH 6,6: campurkan 37,5 ml larutan stok A dengan 62,5 ml larutan stok B.

Periksalah pHnya. Tambahkan larutan A untuk menaikkan pH atau larutan B untuk menurunkan pH sebagaimana perlu.

² *Manual of basic techniques for a health laboratory*, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2003.

Membuka, menutup, mengguncang botol, dan memusing bahan harus dilakukan dengan sangat hati-hati. Produksi aerosol yang terinfeksi dapat menginfeksi petugas laboratorium dan prosedur kesehatan kerja yang sesuai harus diterapkan.¹

Pengiriman biakan *M. tuberculosis* melalui pos ke laboratorium rujukan nasional menimbulkan risiko khusus terjadinya kecelakaan atau pecahnya penampung. Hanya penampung yang disetujui dan materi pengiriman yang sesuai dengan ketentuan pos yang boleh digunakan.

¹ *Laboratory services in tuberculosis control Part I: Organization and management*. Geneva, World Health Organization, 1998 (Dokumen WHO/TB/98.258 yang belum dipublikasi).

Penyakit menular seksual

Pendahuluan

Jumlah mikroorganisme yang diketahui ditularkan atau dapat ditularkan melalui hubungan seksual, serta cakupan sindrom klinis yang terkait dengan agen-agen tersebut telah berkembang pesat selama dua puluh tahun terakhir. Tabel 21 menyajikan pilihan mikroorganisme yang dapat ditularkan melalui hubungan seksual dan penyakit yang ditimbulkannya. Diagnosis etiologis beberapa keadaan tersebut merupakan tantangan besar laboratorium mikrobiologi klinis. Diagnosis laboratorium merupakan komponen esensial dalam penatalaksanaan dan pengendalian penyakit seperti gonore dan sifilis, dan berimplikasi bukan hanya pada pasien tetapi juga pada pasangan seksualnya.

Bagian ini membahas secara singkat identifikasi mikroorganisme tersering yang dapat ditularkan secara seksual, dan ditemukan dalam spesimen saluran kelamin wanita dan pria. Agen virus dan bakteri seperti *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, dan *Mobiluncus* spp. tidak akan dibahas

Tabel 21. Mikroorganisme yang dapat ditularkan melalui hubungan seksual dan sindrom terkait

Agen penyebab	Sindrom
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Bartholinitis, servitis, korioamnionitis, konjungtivitis, infeksi gonokok sistemik (arthritis, dermatitis, tenosinovitis), endometritis, epididimitis, infertilitas, faringitis, vaginitis prepubertal, perihepatitis, proktitis, prostatitis, salpingitis, uretritis
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar D-K)	Bartholinitis, servitis, konjungtivitis pada bayi, endometritis, epididimitis, pneumonia pada bayi, infertilitas, otitis media pada bayi, penyakit radang panggul (PID), perihepatitis, vaginitis prepubertal, proktitis, sindrom Reiter, salpingitis, uretritis
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar L ₁ , L ₂ , L ₃)	Limfogranuloma venereum
<i>Treponema pallidum</i>	Sifilis
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Chancroid
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	Granuloma ingunale (donovanosis)
<i>Mobiluncus</i> spp.	Vaginosis bakterialis
Herpesvirus manusia (alfa) (HSV I dan HSV II)	Herpes genital dan orolabial, meningitis, herpes neonatal, proktitis
Sitomegalovirus (CMV)	Infeksi kongenital
Human papilloma virus (HPV)	Kanker serviks, kutil viral
Human immunodeficiency virus (HIV)	Sindrom imunodefisiensi dapatan (AIDS) dan kompleks terkait AIDS
Virus hepatitis B (HBV)	Hepatitis B
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Uretritis, vaginitis
<i>Candida albicans</i>	Balanopostitis, vulvovaginitis

di sini. Untuk keterangan yang lebih luas, pembaca dipersilahkan membaca publikasi WHO yang relevan.¹

Uretritis pada pria

Uretritis pada pria secara klinis ditandai oleh duh uretra dan/ atau disuria, tetapi infeksi asimtomatik oleh *Neisseria gonorrhoeae* atau *Chlamydia trachomatis* sering terjadi. Jika tidak diobati, uretritis gonokok dan klamidia dapat berlanjut menjadi epididimitis. Infeksi rektum dan faring oleh *N. gonorrhoeae* dan *C. trachomatis* dapat terjadi pada pria homoseksual.

Untuk penatalaksanaan pasien, uretritis harus dibedakan menjadi uretritis gonokokal atau uretritis non gonokokal (NGU). Kira-kira separuh kasus NGU disebabkan oleh *C. trachomatis*, tetapi penyebab kebanyakan kasus sisanya belum dapat dijelaskan sepenuhnya. Menurut beberapa penelitian, *Ureaplasma urealyticum* mungkin menyebabkan uretritis, dan *Trichomonas vaginalis* dapat ditemukan pada 1–3 % kasus NGU. Infeksi intrauretral oleh *human herpesvirus* mungkin menghasilkan duh uretra. Bakteri seperti stafilokokus, berbagai Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* spp., dan *Pseudomonas* spp. dapat diisolasi dari uretra pria sehat, tetapi tidak terbukti menyebabkan uretritis.

Pemeriksaan spesimen untuk mencari *C. trachomatis* sulit dan tidak akan dibahas dalam bagian ini. Selain isolasi dengan sistem biakan sel, metode non-biakan untuk deteksi antigen klamidia dengan *enzyme immunoassay*, pemeriksaan imunofluoresensi serta uji amplifikasi asam nukleat telah tersedia baru-baru ini. Cara-cara tersebut, walau menjanjikan, tetap sangat mahal.

Pengambilan dan transpor spesimen

Untuk pengambilan spesimen uretra, lidi kapas dengan diameter yang kecil atau sengkeli bakteriologis steril harus dimasukkan 3–4 cm ke dalam uretra dan diputar perlahan sebelum ditarik keluar. Duh purulen dapat diambil langsung pada lidi kapas atau sengkeli. Komposisi ujung dan batang lidi kapas penting diperhatikan. Untuk biakan *N. gonorrhoeae*, ujung lidi kapas yang diproses dengan arang (*charcoal*) atau ujung lidi kalsium alginat atau Dacron lebih disukai. Jika lidi kapas pengambil bahan yang khusus dan dibuat secara komersial ini tidak tersedia dan digunakan lidi kapas biasa, spesimen harus diinokulasikan segera. Pijat prostat tidak meningkatkan keberhasilan isolasi gonokokus atau klamidia pada kasus uretritis.

Spesimen anorektal diambil dengan memasukkan batang lidi 4–5 cm ke dalam saluran anus. Untuk spesimen orofaring, tempat pengambilan bahan dengan lidi kapas harus mencakup faring posterior dan kript tonsil, dan bahan harus segera diinokulasi pada media.

Idealnya, inokulasi spesimen untuk isolasi *N. gonorrhoeae* harus dibuat langsung pada media biakan di klinik. Media yang sudah diinokulasi harus ditempatkan dalam stoples lilin (*candle jar*) atau dalam udara yang mengandung karbon dioksida 5–10%, dengan kelembaban tinggi. Jika inokulasi ke media dan inkubasi langsung tidak dimungkinkan, harus digunakan media transpor seperti media transpor Amies atau Stuart. Waktu pengiriman harus sesingkat mungkin, dan harus kurang dari 12 jam pada suhu ruang sampai 30° C. Hindari pendinginan dalam lemari pendingin.

Pemeriksaan langsung dan interpretasinya

Kebanyakan penelitian telah menunjukkan bahwa adanya empat atau lebih leukosit polimorfonuklear (PMN) per lapang pandang emersi merupakan indikasi kuat uretritis pada pria. Kriteria ini sangat berguna bagi klinisi yang harus memutuskan perlu tidaknya mengobati pasien dengan keluhan uretra yang tidak jelas.

¹ Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. Geneva, World Health Organization, 1999.

Pada kebanyakan kasus gonore pria, duh bersifat purulen, dan banyak leukosit PMN (>10 per lapang pandang emersi) dapat ditemukan pada sedian apus uretra. Walaupun demikian, ini tidak selalu ditemukan pada NGU, yang menyebabkan reaksi peradangan yang tidak terlalu berat. Apusan dengan lebih dari 4 leukosit PMN per lapang pandang emersi, dan tanpa diplokokus Gram negatif intraselular, sangat sugestif untuk NGU.

Sedian apus yang tipis, yang dibuat dengan menggelindingkan lidi kapas pada kaca objek, harus difiksasi dengan api dan dipulas biru metilen atau Gram. Adanya diplokokus Gram-negatif intraselular dalam leukosit PMN pada sedian apus uretra sangat sugestif untuk gonore.

Sedian apus spesimen intra-uretra pulasan Gram dari pria yang asimtomatik, dari usap rektum yang *blind*, atau dari sampel orofaring tidak dianjurkan. Walaupun demikian, pemeriksaan mikroskopik bahan purulen yang didapatkan dengan bantuan anoskopi mempunyai nilai diagnostik yang cukup tinggi.

Biakan *Neisseria gonorrhoeae*

Lempeng agar modifikasi Thayer-Martin (MTM)¹ (atau media New York City (NYC))² yang telah diinokulasi harus diinkubasi pada suhu 35° C dalam udara lembab yang diperkaya dengan karbon dioksida (stoples lilin), dan harus diobservasi tiap hari selama 2 hari. Laboratorium yang mengerjakan sejumlah besar spesimen untuk *N. gonorrhoeae* sering kali lebih suka menggunakan agar coklat non-selektif yang diperkaya dengan IsoVitaleX, atau suplemen yang setara, selain media MTM yang selektif, karena sebanyak 3–10% galur gonokokus di daerah tertentu mungkin peka terhadap konsentrasi vancomycin yang digunakan dalam media selektif.

Koloni gonokokus mungkin masih belum tampak setelah 24 jam. Koloni tersebut timbul setelah 48 jam sebagai koloni kelabu sampai putih, opak, menonjol, dan berkilau, dengan ukuran dan morfologi yang berbeda.

Identifikasi *Neisseria gonorrhoeae*

Identifikasi presumtif *N. gonorrhoeae* yang diisolasi dari spesimen urogenital didasarkan pada reaksi oksidase yang positif serta sedian apus pulasan Gram yang menunjukkan diplokokus Gram negatif. Kepastian identifikasi dapat diperoleh dengan uji degradasi karbohidrat atau uji lain menggunakan metode dan media yang dibahas secara luas di kepustakaan lain.³

¹ Agar modifikasi Thayer-Martin dibuat dengan menambahkan campuran antimikroba dan IsoVitaleX atau suplemen yang setara pada suhu 50°C ke dalam agar coklat yang dibuat dari agar GC atau agar Columbia sebagai media dasar. Campuran antimikroba yang mengandung 3 atau 4 antimikroba tersedia secara komersial dari beberapa sumber; campuran VCN mengandung vancomycin, colistin, amfoterisin, dan nistatin; campuran VCNT juga mengandung trimetoprim.

Konsentrasi akhir antimikroba dalam media yang dibuat adalah:

- vancomycin: 3 µg/ml
- colistin: 7,5 µg/ml
- nistatin: 12,5 IU/ml
- trimetoprim laktat: 5 µg/ml

² Modifikasi media New York City dibuat dengan menambahkan suplemen-suplemen berikut ke dalam 500 ml agar dasar GC yang didinginkan sampai suhu 50° C:

- 50 ml darah kuda yang telah dilisiskan dengan penambahan saponin 5 ml/l,
- otolizat ragi steril,
- campuran antimikroba yang mengandung vancomycin, colistin, amfoterisin dan trimetoprim.

Bahan-bahan tersebut tersedia secara komersial dari Oxoid Ltd, Wade Rd, Basingstoke, Hants RG24 8PW, Inggris.

³ Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. Geneva, World Health Organization, 1999.

Uji kepekaan antimikroba

Kepekaan galur *N. gonorrhoeae* terhadap bensilpenisilin memiliki variasi geografik yang cukup besar. Di beberapa daerah, seperti Afrika sub-Sahara atau Asia Tenggara, sebagian besar galur gonokokus sekarang menghasilkan β -laktamase. Resistensi terhadap bensilpenisilin yang diperantarai kromosom dan bukan didasarkan pada produksi β -laktamase juga menjadi lebih sering di banyak negara. Walaupun demikian, uji difusi cakram tidak dapat diandalkan untuk mendeteksi galur-galur tersebut.

Di daerah-daerah tempat bensilpenisilin, ampicilin, atau amoksisilin masih digunakan dalam pengobatan infeksi gonokokus, isolat *N. gonorrhoeae* (khususnya dari kasus-kasus dengan kegagalan pengobatan) harus diskriminasi secara rutin untuk melihat produksi β -laktamase dengan salah satu dari uji-uji yang disarankan, seperti uji Nitrocefin.¹ Untuk uji Nitrocefin, dibuat suspensi pekat dari beberapa koloni dalam tabung kecil berisi 0,2 ml larutan saline; kemudian 0,025 ml Nitrocefin ditambahkan ke dalam suspensi dan dicampur selama satu menit. Perubahan warna yang cepat dari kuning menjadi merah muda atau merah, menunjukkan bahwa galur tersebut menghasilkan β -laktamase.

Uji kepekaan antimikroba untuk *N. gonorrhoeae* dengan uji difusi cakram tidak disarankan dalam praktek rutin.

Spesimen genital dari wanita

Flora vagina pada wanita pra-menopause biasanya paling banyak mengandung *Lactobacillus* serta berbagai macam bakteri anaerob dan aerob fakultatif.

Duh vagina abnormal mungkin disebabkan oleh:

- vaginitis: *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*;
- vaginosis bakterialis: pertumbuhan berlebih kuman anaerob dan *Mobiluncus* spp.;
- servisitis: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*.

Bakteri lain, seperti Enterobacteriaceae, bukan penyebab vaginitis yang telah terbukti. Vaginitis pada anak perempuan prapubertas mungkin disebabkan oleh *N. gonorrhoeae* atau *C. trachomatis*.

Vaginosis bakterialis (vaginitis nonspesifik) adalah keadaan yang ditandai oleh duh vagina yang banyak dan berbau busuk, yang disertai dengan peningkatan bermakna *Mobiluncus* spp. dan berbagai anaerob obligat, serta berkurangnya jumlah laktobasilus vagina. Persyaratan diagnostik minimum untuk vaginosis bakterialis, yakni sedikitnya tiga dari tanda-tanda berikut: duh vagina abnormal, pH vagina > 4,5, *clue cell* (sel epitel dengan banyak sekali bakteri yang melekat sehingga batas sel menjadi kabur), dan bau amis jika duh vagina diberi setetes kalium hidroksida 10%.

Uretritis pada wanita juga sering disebabkan oleh *N. gonorrhoeae* dan *C. trachomatis*.

Infeksi ascendens *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, kuman anaerob vagina serta bakteri anaerob fakultatif dapat menyebabkan penyakit radang panggul (PID), dengan infertilitas dan kehamilan ektopik sebagai sekuele lanjut.

Infeksi genital oleh bakteri, termasuk *N. gonorrhoeae* dan *C. trachomatis*, selama kehamilan dapat menyebabkan komplikasi seperti persalinan prematur, ketuban pecah dini, korioamnionitis, dan endometritis pascapartus pada ibu, serta konjungtivitis, pneumonia, dan sindrom infeksi amnion pada neonatus.

¹ Reagen Nitrocefin tersedia dari Oxoid Ltd, Wade Rd, Basingstoke, Hants RG24 8PW, Inggris, dan terdiri dari 1 mg Nitrocefin (SR112) dan 1 vial cairan rehidrasi (SR112A). Uji tabung dapat diganti dengan uji cakram, menggunakan cakram kertas yang mengandung Nitrocefin (cakram Cefinase, tersedia dari BD Diagnostic Systems, 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152, AS).

Dengan permintaan khusus, spesimen servikovaginal dapat dibiakkan untuk bakteri, seperti *S. aureus* (sindrom renjatan toksik), *S. agalactiae* (streptokokus grup B, infeksi neonatus), *Listeria monocytogenes* (infeksi neonatus), dan *Clostridium* spp. (aborsi septik).

Walaupun infeksi oleh *C. trachomatis* dan herpesvirus manusia sering ditemukan, dan dapat menyebabkan morbiditas yang bermakna, diagnosis laboratoriknya memerlukan peralatan dan reagen yang mahal dan tidak akan dibahas di sini.

Pengambilan dan transpor spesimen

Semua spesimen harus diambil selama pemeriksaan panggul menggunakan spekulum. Spekulum dapat dibasahi dengan air hangat sebelum digunakan, tetapi jangan menggunakan antiseptik atau krim eksplorasi ginekologis karena dapat mematikan gonokokus.

Untuk pemeriksaan ragi, *G. vaginalis* dan vaginosis bakterialis, sampel duh vagina dapat diambil dengan lidi kapas dari forniks posterior vagina. Sampel untuk biakan gonokokus dan chlamydia harus diambil dari endoserviks. Setelah memasukkan spekulum, lendir serviks harus dihapus dengan bola kapas. Lidi kapas untuk mengambil sampel (lihat hal. 72) kemudian harus dimasukkan ke dalam kanalis servikalis dan diputar selama sedikitnya 10 detik sebelum lidi kapas ditarik.

Spesimen uretra, anorektal, dan orofaring untuk gonokokus dapat diambil dengan cara yang sama dengan yang dilakukan pada pria.

Pada semua kasus penyakit radang panggul (PID), sekurang-kurangnya, harus diambil sampel serviks untuk *N. gonorrhoeae*. Pengambilan sampel dari tuba falopii lebih dapat diandalkan, tetapi di kebanyakan daerah, aspirat *cul-de-sac* adalah sampel terbaik yang tersedia.

Pada bayi dengan oftalmia neonatorum, eksudat konjungtiva harus diambil dengan lidi kapas atau sengkeli.

Media transpor Stuart dan Amies cocok untuk pengiriman sampel serviks dan vagina, dengan pengecualian pada spesimen yang akan diperiksa *C. trachomatis*.

Pemeriksaan langsung dan interpretasi

Pemeriksaan langsung duh vagina merupakan metode pilihan untuk diagnosis etiologis vaginitis, tetapi kurang berguna untuk diagnosis servisitis.

Sediaan basah dibuat dengan mencampur sampel vagina dengan larutan saline pada kaca objek, setelah itu tutup dengan kaca tutup. Preparat yang encer lebih disukai untuk memastikan sel-sel terpisah, yang jika tidak encer mungkin bergerombol. Sediaan diperiksa pada pembesaran 400× untuk mencari *T. vaginalis* dengan gerakan yang khas, ragi yang bertunas (*budding*), dan *clue cell*. *C. albicans* mungkin membentuk pseudomiselium, yang kadang-kadang dapat ditemukan dalam bahan vagina. *Clue cell* ditemukan pada sebagian besar wanita dengan vaginosis bakterialis. Gambaran sitoplasma sel epitel yang tampak kotor atau granular adalah kriteria yang kurang objektif dibandingkan hilangnya batas sel. Pemeriksaan mikroskopik sediaan basah spesimen serviks tidak dianjurkan.

Pembuatan sediaan apus pulasan Gram adalah metode pilihan untuk diagnosis vaginosis bakterialis. Apusan dibuat dengan menggulingkan lidi kapas secara perlahan dan bukan menghapuskannya pada kaca objek. Apusan vagina normal terutama mengandung laktobasilus (batang Gram-positif besar) dan kurang dari 5 leukosit per lapang pandang. Pada sediaan apus khas yang didapat dari wanita pengidap vaginosis bakterialis, *clue cell* tertutup oleh kuman-kuman batang Gram-negatif kecil disertai dengan flora campuran yang terdiri atas sejumlah besar kuman batang Gram-negatif kecil dan kuman batang dan kokobasilus dengan Gram yang bervariasi, dan sering batang bengkok Gram-negatif, tanpa batang Gram-positif besar. Hanya sedikit (<5) leukosit yang ditemukan per lapang

pandang. Gambaran ini merupakan indikator diagnostik yang sensitif dan spesifik untuk vaginosis bakterialis.

Sejumlah besar leukosit (>10 sel per lapang pandang) pada sediaan apus pulasan Gram mengarahkan pada trikomoniasis atau servitis.

Pulasan Gram tidak secara khusus berguna untuk diagnosis infeksi gonokokus pada pasien wanita. Pemeriksaan sediaan apus sekret endoserviks yang dipulas Gram untuk mencari diplokokus Gram-negatif mempunyai sensitivitas 50–70% dan spesifisitas 50–90% untuk diagnosis infeksi gonokokus, menyebabkan nilai prediksi positif yang buruk pada populasi dengan prevalensi gonore yang rendah. Diplokokus Gram negatif intraselular pada sediaan apus serviks harus dilaporkan sebagai diplokokus Gram negatif intraselular, dan bukan sebagai *N. gonorrhoeae* atau gonokokus. Hindarkan interpretasi berlebihan sediaan apusan serviks yang sering kali mengandung kokobasil Gram-negatif dan batang yang terpulas bipolar.

Yang menarik dari sediaan apus serviks adalah validitasnya dalam diagnosis servitis mukopurulen: keberadaan lebih dari 10 leukosit polimorfonuklear per lapang pandang emersi adalah indikasi yang cukup baik untuk servitis mukopurulen, paling sering disebabkan oleh *N. gonorrhoeae* dan/atau *C. trachomatis*.

Pemeriksaan sediaan apus konjungtiva yang dipulas Gram adalah teknik yang sensitif dan spesifik untuk diagnosis konjungtivitis gonokokal. Adanya diplokokus Gram negatif intraselular bersifat diagnostik untuk konjungtivitis gonokokal.

Biakan

Spesimen serviks, rektum, uretra, konjungtiva, dan *cul-de-sac* dapat dibiakkan untuk *N. gonorrhoeae* dengan metode yang dijelaskan pada hal. 73. Spesimen harus diproses segera setelah tiba di laboratorium atau, lebih baik lagi di klinik itu sendiri. Tidak seperti pada pria, biakan harus dikerjakan untuk mendiagnosis infeksi gonokokus pada wanita. Sensitivitas biakan tunggal untuk diagnosis gonore pada wanita adalah 80–90%. Sensitivitasnya lebih rendah untuk spesimen yang diambil pada periode peripartum.

Biakan untuk *G. vaginalis* atau kuman anaerob tidak dianjurkan untuk diagnosis vaginosis bakterialis karena organisme-organisme tersebut didapatkan pada 20–40% wanita tanpa infeksi vagina. Adanya *G. vaginalis* dalam duh vagina sendiri bukan merupakan indikasi pengobatan, dan hanya pasien-pasien yang memenuhi kriteria diagnostik vaginosis bakterialis yang harus diobati untuk itu.

Jika dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopik, biakan meningkatkan deteksi *C. albicans* sebesar 50–100%. Metode biakan biasanya lebih efisien jika jumlah organisme sedikit. Walaupun demikian, *C. albicans* dalam jumlah sedikit dapat ditemukan dalam vagina 10–30% wanita tanpa tanda ataupun gejala vaginitis, dan hanya *C. albicans* dalam jumlah besar yang harus dipikirkan sebagai petunjuk adanya kandidiasis vagina. Oleh karena itu, biakan tidak dianjurkan. Biakan untuk *G. vaginalis* terutama akan mendeteksi pembawa yang asimtomatik jika dikerjakan bersama sediaan basah, dan sebaiknya tidak dikerjakan.

Spesimen dari tukak genital

Tukak genital adalah masalah yang sangat sering ditemukan di banyak negara berkembang. Diagnosis etiologis dan penatalaksanaannya merupakan tantangan bagi klinisi dan juga petugas laboratorium. Infeksi campuran sering ditemukan. Lesi ulseratif pada genital dapat disebabkan oleh berbagai agen yang dapat ditularkan secara seksual:

- herpesvirus manusia
- *Treponema pallidum*

- *Haemophilus ducreyi*
- *Calymatobacterium granulomatis*, penyebab granuloma inguinale (Donovanosis)
- *Chlamydia trachomatis* serovar L₁, L₂, L₃

Herpes genitalis adalah penyebab tersering penyakit tukak genital di kebanyakan negara industri, dan merupakan penyebab komplikasi yang mengancam jiwa pada pasien-pasien dengan imunodefisiensi dan neonatus yang lahir dari wanita yang menderita infeksi tersebut. Diagnosis laboratoriumnya tidak akan dibahas di sini.

Sifilis masih merupakan penyakit paling serius yang menimbulkan lesi genital karena sifilis dapat menyebabkan sekuele lanjut yang berat dan sifilis kongenital. Pemeriksaan serologis memegang peran penting dalam diagnosis semua stadium sifilis, tetapi hanya pemeriksaan lapangan gelap yang akan dibahas di sini. Teknik dan interpretasi uji serologis untuk sifilis telah dibahas secara luas dalam kepustakaan lain.¹

Chancroid (ulcus molle) adalah penyebab utama ulserasi genital di banyak daerah berkembang. Gambaran klinisnya meliputi tukak(-tukak) yang nyeri dan purulen disertai pembesaran kelenjar inguinal (bubo) yang nyeri dan kadang-kadang supuratif. Tidak diketahui adanya sekuele lanjut. Diferensiasi klinis dari penyakit tukak genital lainnya sulit dilakukan. *Chancroid* meningkatkan risiko mendapat infeksi HIV.

Granuloma inguinale ditandai oleh tukak genital yang luas, seperti daging, merah, dan bergranulasi. Jarang terjadi pembentukan bubo.

Limfogranuloma oleh *chlamydia* biasanya disertai dengan limfadenopati inguinal dan/ atau femoral dan, lebih jarang, disertai tukak-tukak kecil yang menyembuh secara spontan. Diagnosisnya didasarkan pada uji serologis dan isolasi *C. trachomatis* serovar L₁, L₂, L₃.

Pengambilan spesimen

Treponema pallidum: Harus memakai sarung tangan bedah untuk pelindung. Tekan tukak antara dua jari dan bersihkan permukaan lesi dengan larutan saline, menggunakan kain kassa. Krusta harus diangkat bila ada. Setelah menghapus tetes-tetes darah pertama (jika ada), ambil sampel eksudat serosa dengan menyentuh suatu kaca objek yang bersih ke permukaan lesi. Segera letakkan kaca tutup bersih dengan erat pada tetesan eksudat. Sebagai alternatif, spesimen dapat diaspirasi dari lesi, atau dari kelenjar getah bening yang membesar, dengan menggunakan jarum dan semprit steril. Preparat harus diperiksa segera oleh seorang ahli mikroskopi yang berpengalaman pada mikroskop lapangan gelap.

Haemophilus ducreyi: Spesimen harus diambil dari dasar tukak dengan lidi kapas dan diinokulasikan langsung pada media isolasi. Bahan dapat juga diaspirasi dari bubo inguinal, tetapi keberhasilan isolasi *H. ducreyi* dari sini lebih kecil dibandingkan dari lesi genital. Media transpor untuk *H. ducreyi* belum dievaluasi.

Jika dicurigai granuloma inguinale, idealnya harus dibuat biopsi jaringan di bawah permukaan pada daerah dengan granulasi aktif. Sediaan apus segar harus dibuat dari sepotong materi biopsi yang dihancurkan. Sebagai alternatif, dapat dibuat apusan dengan mengerok permukaan lesi.

Pemeriksaan langsung

Demonstrasi adanya treponema dalam materi lesi adalah metode pilihan untuk diagnosis sifilis primer. Walaupun *T. pallidum* dapat dipulas (misalnya, dengan perak nitrat), mikroskopi lapangan ge-

¹ Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. Geneva, World Health Organization, 1999.

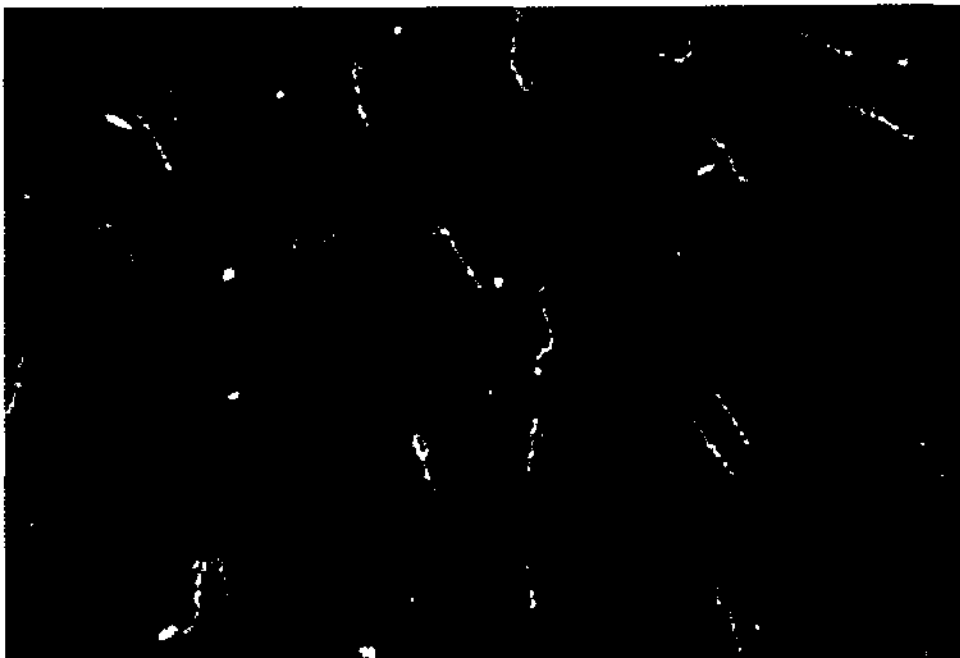
lap dianjurkan karena lebih sensitif dan spesifik. Mikroskop yang dilengkapi dengan sumber cahaya yang baik dan kondensor lapangan gelap harus tersedia untuk pemeriksaan lapangan gelap. Kondensor lapangan gelap menghalangi berkas cahaya langsung, dan hanya berkas cahaya perifer (yang dibelokkan oleh objek-objek seperti treponema) yang dibiarkan lewat.

Teteskan beberapa tetes minyak emersi pada kondensor mikroskop lapangan gelap. Turunkan kondensor sedikit sehingga minyak berada di bawah tinggi landasan mikroskop. Letakkan kaca objek pada mikroskop dan naikkan kondensor sehingga terdapat kontak yang baik antara minyak dan bagian bawah kaca objek. Dengan hati-hati hindarkan terperangkapnya gelembung udara dalam minyak.

Gunakan objektif pembesaran lemah (10×) untuk memfokuskan spesimen. Pusatkan cahaya di tengah lapang pandang dengan mengatur baut penengah yang terletak pada kondensor, dan fokuskan kondensor dengan menaikkan atau menurunkannya sampai didapatkan diameter cahaya terkecil. Pusatkan kembali cahaya bila perlu. Kemudian, gunakan objektif 40× yang kering untuk memfokuskan spesimen dan periksalah kaca objek dengan teliti. Kontras akan lebih baik jika pemeriksaan mikroskopi dilakukan dalam gelap. Hindari cahaya matahari yang terang.

T. pallidum tampak putih bercahaya pada latar belakang gelap (Gbr. 9). Kuman ini dikenali dari morfologi, ukuran, dan gerakannya yang khas. Kuman ini adalah organisme yang tipis (0,25–0,3 µm), panjang 6–16 µm, dengan 8–14 spiral dalam yang beraturan dan terpilin kecil. *T. pallidum* menunjukkan pergerakan yang cepat dan agak mendadak. Kuman ini berotasi relatif lambat pada sumbu panjangnya (seperti pembuka sumbat botol). Rotasi ini disertai dengan pembengkokan (pemutaran) di tengah dan dijalankan dengan agak kaku. Mungkin ditemukan pemanjangan dan pemendekan (seperti spiral pegas yang elastis). Distorsi dapat terjadi dalam bentuk penggulangan yang bengkok-bengkok. Jika organisme tersebut melekat pada, atau terhambat oleh, objek yang lebih berat, upaya kuman tersebut akan menyebabkan distorsi pada ulirnya. Spiroketa non-sifilis lain mungkin ulirnya lebih besar, tebal dan kasar; pergerakannya berbeda (tidak seperti pembuka tutup botol), tetapi mengambil bentuk gerakan yang lebih tidak teratur (seperti memberontak) dengan fleksi yang jelas dan relaksasi ulir yang lebih sering.

Gambar 9. Penampakan *T. pallidum* pada mikroskopi lapangan gelap [Negatif]



Demonstrasi treponema dengan morfologi dan karakteristik motilitas *T. pallidum* mendasari diagnosis positif untuk sifilis primer dan sekunder. Pasien-pasien dengan *chancre* primer, yang positif pada pemeriksaan lapangan gelap, mungkin negatif secara serologis. Mereka biasanya menjadi reaktif secara serologis dalam beberapa minggu.

Kegagalan untuk menemukan organisme tidak menyingkirkan diagnosis sifilis. Hasil negatif mungkin berarti:

- jumlah organisme yang ada tidak cukup (pemeriksaan lapangan gelap tunggal mempunyai sensitivitas tidak lebih dari 50%).
- Pasien sudah makan obat antimikroba.
- Lesi sudah mendekati kesembuhan alamiah.
- Lesinya bukan lesi sifilis.

Apapun hasil pemeriksaan lapangan gelap, sampel darah harus diambil untuk pemeriksaan serologis.

Pada diagnosis *granuloma inguinale*, dapat ditemukan basil-basil intraseluler berkapsul yang khas di dalam histiosit apabila sediaan apus yang difiksasi dengan aseton dipulas dengan Giemsa. Diagnosis penyakit ini dibahas secara lengkap dalam kepustakaan lain.¹

Untuk diagnosis *chancroid*, sediaan apus pulasan Gram tidak dianjurkan karena sensitivitas dan spesifisitasnya kurang dari 50%. Sediaan apus pulasan Giemsa tidak dianjurkan untuk mendiagnosis limfogranula *chlamydia*. Walaupun demikian, bahan dari tukak harus juga diperiksa dengan mikroskop lapangan gelap untuk mencari *T. pallidum*.

Biakan

Gonokokus kadang-kadang diisolasi dari tukak genital, tetapi kemaknaannya dalam spesimen tersebut tidak jelas. Selain *H. ducreyi*, tidak ada spesies bakteri lain—entah fakultatif aerob entah obligat anaerob—yang telah terbukti menyebabkan penyakit tukak genital.

Spesimen yang akan diperiksa untuk *H. ducreyi* harus diinokulasikan langsung pada lempeng agar yang selektif dan diperkaya.² Media yang digunakan tidak boleh lebih dari 1 minggu. Lempeng agar harus diinkubasi pada suhu 33–35°C dalam stoples lilin dengan handuk basah pada bagian bawahnya. Setelah inkubasi selama 48–72 jam, tampak koloni-koloni kecil, non-mukoid, kuning-kelabu, semiopak atau translusen, yang dapat digeser secara utuh pada permukaan agar. Sensitivitas biakan tunggal untuk isolasi *H. ducreyi* adalah 70–80%.

Diagnosis presumtif *H. ducreyi* dapat dibuat berdasarkan morfologi koloni yang khas pada media selektif, dan demonstrasi adanya kokobasil Gram negatif yang kecil, pleomorfik, kadang dalam bentuk rantai tunggal (streptobasil), rantai sejajar (“kelompokan ikan”), atau gumpalan, dalam koloni yang dicurigai. Walaupun *H. ducreyi* bergantung pada hemin, sebagian besar isolat klinis tidak tumbuh pada media yang digunakan untuk menentukan kebutuhan akan faktor X dan V. Hampir semua isolat baru dari negara berkembang menghasilkan β -laktamase.

¹ Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases*. Geneva, World Health Organization, 1999.

² Agar basa Mueller-Hinton, ditambahkan dengan darah kuda 5% yang dipanaskan sampai suhu 75°C, IsoVitateX 1% dan vancomycin 3 g/ml.

Eksudat purulen, luka dan abses

Pendahuluan

Salah satu proses penyakit infeksi yang paling sering ditemukan adalah produksi eksudat purulen (kadang seropurulen) sebagai akibat invasi bakteri pada kavitas (rongga), jaringan, atau organ tubuh. Infeksi demikian mungkin merupakan “jerawat” yang relatif sederhana dan tidak berbahaya, atau serangkaian kantung-kantung pus (nanah) yang ditemukan dalam abses pada satu lokasi anatomis atau lebih. Eksudat yang terdiri dari sel darah putih, terutama didominasi leukosit polimorfonuklear, organisme yang menginvasi, serta campuran cairan tubuh dengan fibrin. Pada beberapa kasus, eksudat dapat ditemukan sebagai lapisan di permukaan organ, misalnya permukaan otak pada meningitis bakterialis akut. Pada kasus lain, eksudat mungkin terkurung oleh lapisan-lapisan fibrin dan jaringan sel jaringan, misalnya, karbunkel atau “bisul” subkutan, sedangkan pada kasus lain lagi, eksudat mungkin dikaitkan dengan luka terbuka, yang dengan demikian mengeluarkan cairan kental atau pus.

Sama seperti lokasi anatomis tempat produksi eksudat yang sangat bervariasi, demikian pula organisme yang terlibat dalam infeksi yang mendasarinya. Semua bakteri yang merupakan bagian dari flora normal, atau yang mendapatkan jalan masuk ke dalam tubuh, mungkin terlibat dalam produksi eksudat. Beberapa jamur, khususnya yang mampu berkembangbiak dalam jaringan tubuh, juga dapat terlibat dalam produksi eksudat. Sebaliknya, eksudat purulen jarang dihasilkan pada infeksi virus.

Ahli mikrobiologi yang memeriksa haruslah menyadari keberagaman lokasi anatomis dan mikroorganisme yang terlibat, dan siap untuk melakukan pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik yang sesuai serta inokulasi media primer yang benar untuk mendapatkan organisme(-organisme) utama yang terkait. Begitu organisme tersebut telah diisolasi dalam biakan murni, proses identifikasi dan uji kepekaan antimikroba harus dilakukan sesegera mungkin.

Komunikasi antarklinisi dengan ahli mikrobiologi sangat penting dalam diagnosis dan penatalaksanaan pasien dengan penyakit infeksi supuratif. Ahli mikrobiologi harus bekerjasama dengan dokter untuk memastikan pengambilan spesimen yang benar dan pengiriman spesimen yang cepat untuk pemrosesan yang cepat dan tepat.

Keadaan klinis yang sering ditemukan dan agen penyebab tersering

Spesimen bedah

Spesimen bedah mungkin diambil dengan cara aspirasi abses yang terlokalisasi atau prosedur bedah lain. Ahli bedah disarankan untuk mengambil beberapa sampel jaringan kecil yang representatif dari setiap eksudat purulen. Jika mungkin, hindari penggunaan lidi kapas. Eksudat harus diambil menggunakan jarum dan spuit. Jika lidi kapas terpaksa digunakan, eksudat dikumpulkan sebanyak mungkin dan dipindahkan ke dalam penampung yang sesuai untuk dikirim ke laboratorium. Pada saat menerima, laboratorium harus membaca informasi yang tersedia dan kemudian merencanakan biakan untuk organisme yang mungkin ditemukan dalam spesimen tersebut.

Beberapa contoh keadaan dan organisme yang ditemukan pada berbagai jenis spesimen bedah dijabarkan di bawah ini:

- *Rongga peritoneum* kemungkinan mengandung bakteri enterik Gram-negatif (*Enterococcus*), batang Gram-negatif anaerob (*Bacteroides fragilis*), dan klostridia.

- *Abses* yang ber dinding dapat mengandung berbagai jenis organisme, baik spesies tunggal maupun multipel: kokus Gram-positif dan batang Gram-negatif adalah yang paling sering diisolasi. Bakteri anaerob dan amuba mungkin juga perlu dipikirkan, tergantung lokasi abses.
- *Kelenjar getah bening* sering terlibat dalam infeksi sistemik. Kelenjar mengalami pembengkakan dan sering nyeri tekan, eksudat purulen sering terakumulasi. Jika kelenjar berfluktuasi, kandungan cairan dapat diaspirasi oleh dokter. Biopsi atau aspirat kelenjar dari anak harus dibiakkan untuk *Mycobacterium tuberculosis* dan mikobakteria lain. Selain untuk membiakkan stafilokokus, streptokokus dan bakteri enterik Gram-negatif, kelenjar getah bening merupakan spesimen yang baik untuk diagnosis mikosis sistemik dan subkutan (histoplasmosis, sporotrikosis).
- *Kulit dan jaringan subkutan* merupakan target utama abses dan infeksi luka. Sesuai aturan umum, abses subkutan disebabkan oleh stafilokokus. Lesi kulit yang terbuka dan bemanah sering melibatkan streptokokus β -hemolitikus dan/ atau stafilokokus, seperti pada impetigo. Variasi lesi kulit lain yang memerlukan intervensi bedah dan sering ditemukan sebagai infeksi nosokomial adalah ulkus dekubitus atau *bed sore*. Bakterinya seringkali adalah komensal pada kulit atau flora usus yang telah berproliferasi di bagian terluar ulkus dan menghasilkan bau dan tampilan yang tidak sedap. Biakan rutin untuk organisme tersebut tidak relevan secara klinis. Organisme yang paling sering diisolasi dari jaringan biopsi adalah batang enterik; organisme yang sama mungkin ditemukan dalam biakan eksudat superfisial. Menilai peran organisme-organisme tersebut dalam ulkus dekubitus tidaklah selalu memungkinkan, tetapi penyembuhan memerlukan kondisi ulkus tetap bersih, kering, dan bebas bakteri. Kadang-kadang organisme dalam ulkus dekubitus dapat masuk ke dalam aliran darah dan menyebabkan komplikasi yang serius.
- *Luka bakar*, khususnya derajat dua atau tiga, cenderung mengalami infeksi oleh berbagai spesies bakteri. Debridemen (pembersihan jaringan) bedah yang teliti sangat penting dilakukan sebelum pengambilan bahan biakan. Stafilokokus dan *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri yang paling sering ditemukan.
- *Eksudat*. Kadang-kadang cairan serosa atau purulen akan berkumpul dalam rongga yang pada keadaan normal mengandung sangat sedikit cairan steril, misalnya rongga perikardium, rongga pleura, bursa, atau sendi. Aspirasi dengan jarum dalam kondisi aseptik akan menghasilkan spesimen laboratorium, yang dari padanya organisme yang menginfeksi dapat diisolasi dan diidentifikasi. Penyebab eksudat biasanya bakteri, tetapi bisa juga jamur atau virus. Infeksi umumnya monospesifik, tetapi dapat terjadi infeksi campuran aerob dan anaerob. Aspirat dari rongga pleura mungkin menghasilkan penumokokus, streptokokus, *H. influenzae*, streptokokus anaerob, atau batang Gram-negatif anaerob (*Prevotella* dan *Porphyromonas*), atau *M. tuberculosis*.

Luka tembus

Semua lesi yang disebabkan oleh benda tajam yang menembus kulit mungkin mengandung campuran mikroorganisme; organisme-organisme tersebut umumnya merupakan bagian dari flora kulit atau flora mikroba normal di tanah atau air. Luka tembus yang melibatkan kerusakan usus akan menimbulkan ancaman yang lebih serius karena flora usus mungkin menyebabkan infeksi luka dan infeksi rongga peritoneum.

Luka tembus atau *luka potong* mungkin disebabkan oleh benda tajam atau tumpul. Logam, kaca, kayu, dll sering menyebabkan luka tembus, baik yang diakibatkan oleh kecelakaan atau kesengajaan (misalnya luka tusuk atau tembak). Tetanus yang diakibatkan oleh luka tembus merupakan penyakit yang mengancam jiwa pada individu yang tidak diimunisasi. Demikian juga, botulisme luka mungkin tidak akan terdiagnosis bila dokter dan ahli mikrobiologi tidak mewaspadai kemungkinan ini. Diagnosis tetanus dan botulisme paling baik dibuat secara klinis, dan dukungan laboratorium harus diberikan oleh laboratorium rujukan pusat. Orang-orang yang bekerja dengan hewan atau produk hewan berisiko terinfeksi spora *Bacillus anthracis*, yang mungkin masuk melalui luka kecil atau kulit lecet dan menyebabkan eskar hitam yang khas pada antraks. Organisme tanah lainnya, seperti *Clostridium perfringens*, mungkin terlibat dalam luka tembus yang dalam dan menghasilkan gangren gas.

Gigitan atau cakaran hewan sering terjadi baik di daerah perkotaan maupun pedesaan. Gigitan mungkin berasal dari hewan peliharaan rumah, hewan ternak, atau hewan liar. Rabies harus menjadi perhatian utama dan segera. Begitu kemungkinan rabies telah disingkirkan, kemungkinan agen etiologi lain akan banyak dan bervariasi. Diagnosis rabies terlalu spesialisistik untuk dibicarakan dalam buku pegangan ini.¹

Mulut semua hewan mengandung flora heterogen yang terdiri dari bakteri aerob dan anaerob, ragi, protozoa dan virus. Infeksi yang diakibatkan oleh gigitan atau cakaran terutama disebabkan oleh bakteri. Contoh utamanya adalah infeksi oleh *Pasteurella multocida*, yang sering menyertai gigitan anjing atau kucing bila luka gigitan tidak dibersihkan dan diobati dengan benar. Gigitan manusia kadang-kadang dapat menyebabkan infeksi campuran bakteri aerob dan anaerob yang serius.

Infeksi luka nosokomial

Salah satu masalah utama dalam perawatan dan pengobatan pasien rawat-inap di rumah sakit adalah bahwa pasien tersebut tidak boleh dirugikan dalam upaya diagnosis dan pengobatan penyakitnya. Sayangnya 5–10% pasien rawat inap mendapatkan infeksi selama di rumah sakit. Infeksi nosokomial merugikan pasien dan biasanya dapat dihindari atau dikurangi secara signifikan. Banyak infeksi yang didapat di rumah sakit diketahui berasal dari bagian bedah. Tingkat keseringan infeksi luka pascabedah bervariasi antarrumah-sakit, dan dalam rumah sakit tersebut kemungkinan paling tinggi terjadi pada pasien-pasien yang telah menjalani pembedahan abdomen, toraks atau ortopedi. Infeksi luka bedah mungkin terjadi segera setelah pembedahan atau beberapa hari pascabedah. Lokasi infeksi mungkin terbatas pada garis jahitan atau dapat meluas di dalam lokasi pembedahan. *Staphylococcus aureus* (biasanya resisten bensilpenisilin, dan sekarang sering kali resisten metisilin) merupakan penyebab tersering, diikuti oleh *E. coli* dan bakteri enterik lainnya. Bakteri anaerob dari usus besar pasien mungkin masuk ke dalam lokasi pembedahan, menyebabkan infeksi campuran dan menjadi kejadian yang serius dan cukup sering terjadi di rumah sakit dengan perawatan luka pascabedah dan program pencegahan infeksi yang buruk. *Bacteroides fragilis* dan kadang-kadang *Clostridium perfringens* dapat menginvasi aliran darah, menimbulkan infeksi pascabedah yang sistemik, dan sering menyebabkan kematian.

Suatu infeksi yang menantang namun jarang ditemukan dapat menyertai pembedahan gigi atau mulut, yaitu ketika saluran sinus dari dalam mencari jalan ke permukaan kulit wajah atau leher, dan duh tersebut mengandung granula "sulfur" aktinomikosis.

Pengambilan dan pengiriman spesimen

Tidaklah mungkin menjabarkan prosedur pengambilan spesimen setiap jenis luka, abses, dll secara rinci pada bab ini. Seharusnya jelas bahwa ini merupakan tugas yang memerlukan kerjasama erat antara petugas laboratorium dan dokter. Pada banyak kasus, hanya ada satu kesempatan untuk mendapatkan spesimen; spesimen kedua tidak tersedia pada banyak kasus. Oleh karena itu, pengambilan, pengiriman dan penyimpanan spesimen yang benar sangatlah penting, dan kompromi harus dihindarkan. Begitu spesimen diperoleh, dikemas, dan dikirim ke laboratorium, spesimen harus diproses sesegera mungkin. Setelah pemeriksaan tahap awal telah diselesaikan dan biakan dibuat, spesimen harus dilabel dengan benar, ditutup rapat, dan disimpan dalam lemari pendingin, sampai dipastikan bahwa tidak ada pemeriksaan laboratorium tambahan yang diperlukan.

Abses

Begitu suatu abses atau abses multipel ditemukan, dokter atau ahli bedah dan ahli mikrobiologi harus berkonsultasi mengenai tindakan yang akan dilakukan. Teknik untuk mengambil pus dan potong-

¹ Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds. Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva, World Health Organization, 1996.

an dinding abses adalah suatu prosedur bedah. Jarum dan sempit digunakan untuk menyedot materi purulen sebanyak mungkin, yang kemudian dipindahkan secara aseptik ke dalam penampung spesimen steril. Jika penampung semacam itu tidak tersedia, spesimen harus dibiarkan dalam sempit dengan jarum tertutup dan sempit itu harus dikirim ke laboratorium. Bahan ini harus diproses segera oleh laboratorium; baik biakan aerob maupun anaerob dapat dibuat dari spesimen tunggal.

Situasi serupa terjadi bila ahli bedah menemukan satu atau lebih abses berdinding dalam suatu organ, toraks, abdomen, atau pelvis selama prosedur pembedahan yang dilakukan untuk tujuan lain. Untuk mengantisipasi hal ini, laboratorium harus mengatur agar tersedia perangkat alat (dalam peralatan bedah steril tadi) untuk mengambil isi abses tersebut, sehingga spesimen dapat dikirim segera ke laboratorium untuk diproses. Penggunaan lidi kapas untuk mengambil spesimen dalam jumlah sedikit sedapat mungkin dihindari jika sebenarnya terdapat spesimen dalam jumlah banyak. Penggunaan lidi kapas dapat dibenarkan untuk mengambil pus dalam jumlah yang sangat sedikit, atau pus dari lokasi yang memerlukan kehati-hatian, misalnya dari mata. Jika didapatkan potongan jaringan dari dinding abses, petugas laboratorium harus menggerus jaringan, menggunakan sedikit kaldu steril sebagai pelarut, atau mencincang jaringan menjadi potongan yang sangat halus menggunakan gunting steril. Biakan aerob dan anaerob harus dipersiapkan sebagaimana ditunjukkan dalam hal. 85–86.

Luka lecet, luka tembus, luka pascaoperasi, luka bakar dan ulkus dekubitus yang terinfeksi

Tidak ada prosedur baku yang dapat diformulasikan untuk pengambilan spesimen. Walaupun demikian, pedoman-pedoman dasar tertentu harus diikuti untuk mendapatkan spesimen sebaik mungkin untuk analisis laboratorik. Setelah membersihkan lokasi luka dengan hati-hati, ahli bedah harus memeriksa bagian bawah permukaan untuk pengambilan pus, jaringan yang mati, rembesan gas (krepitasi), atau jejak abnormal lainnya. Potongan-potongan jaringan terlibat yang akan digunakan untuk biakan harus diambil dan diletakkan di atas kasa steril untuk diproses. Pus dan eksudat lain harus diambil dengan hati-hati dan ditempatkan dalam tabung steril. Dapat digunakan lidi kapas bila perlu.

Saluran sinus atau drainase kelenjar limfe

Jika saluran sinus atau kelenjar limfe menunjukkan tanda-tanda drainase spontan, bahan drainase harus diambil dengan hati-hati, menggunakan pipet Pasteur steril yang dipasang karet pengisap, dan ditempatkan dalam tabung steril. Jika tidak tampak duh, ahli bedah harus mengambil bahan purulen tersebut dengan menggunakan sempit dan jarum steril atau sonde. Lidi kapas hanya boleh digunakan bila pipet Pasteur steril tidak tersedia.

Eksudat

Penumpukan cairan abnormal dalam rongga tubuh seperti rongga pleura, sendi atau peritoneum memerlukan tindakan bedah untuk mengisap bahan yang terakumulasi tersebut ke dalam penampung steril untuk kemudian dikirim ke laboratorium untuk pemeriksaan mikrobiologi dan sitologi. Pada kasus-kasus dengan akumulasi yang menetap dan terpasang drain terbuka, cairan drainase perlu diambil dengan cara yang aseptik untuk dilakukan biakan dan uji lanjutan lain.

Penilaian makroskopik

Spesimen pus atau duh luka yang diambil dengan lidi kapas sulit dinilai secara makroskopik, khususnya jika lidi kapas terendam dalam media transpor. Spesimen pus yang diterima dalam sempit atau penampung steril harus dinilai warna, konsistensi, dan baunya secara cermat oleh seorang petugas yang berpengalaman.

Warna

Warna pus bervariasi dari hijau-kuning sampai coklat-merah. Warna merah umumnya terjadi akibat bercampur dengan darah atau hemoglobin. Aspirat dari abses hati amebik primer mempunyai konsistensi seperti gelatin dan berwarna coklat tua sampai coklat kekuningan. Pus dari luka pascaoperasi atau luka traumatik (luka bakar) mungkin berwarna biru-hijau oleh pigmen piosianin yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa*.

Konsistensi

Konsistensi pus dapat bervariasi dari cairan keruh sampai sangat kental dan lengket. Eksudat yang diaspirasi dari sendi, rongga pleura, kantung perikardial, atau rongga peritoneal umumnya berupa cairan, dengan berbagai gradasi antara eksudat serosa dan pus sejati.

Pus yang berasal dari saluran sinus yang mengalir dalam leher harus diinspeksi untuk melihat granula "sulfur" kuning kecil, koloni *Actinomyces israelii*, yang berbentuk benang (filamentosa). Adanya granula sulfur mengarah pada diagnosis aktinomikosis servikofasial. Granula kecil dengan warna berbeda (putih, hitam, merah, atau coklat) khas untuk misetoma, suatu tumor granulomatosa yang umumnya mengenai ekstremitas bawah (misalnya kaki madura) dan ditandai oleh abses multipel serta aliran sinus. Granula-granula berwarna tersebut sesuai untuk bakteri filamentosa atau miselium jamur.

Pus dari "abses dingin" tuberkulosis (dengan sedikit tanda peradangan) kadang-kadang dibandingkan dengan keju lembut dan disebut "kaseum" atau "pus kaseosa".

Bau

Bau busuk adalah salah satu gambaran yang paling khas untuk infeksi anaerob atau infeksi campuran aerob-anaerob walaupun bau ini mungkin tidak ada pada beberapa kasus. Bau tersebut, bersama dengan hasil sediaan apus yang dipulas Gram, harus dilaporkan segera kepada klinisi karena mungkin berguna dalam pemilihan antimikroba yang sesuai secara empiris. Ini juga akan membantu penentuan perlu tidaknya biakan anaerob.

Pemeriksaan mikroskopik

Sediaan apus untuk pulasan Gram dan pemeriksaan haruslah dibuat untuk tiap spesimen. Pada kasus-kasus khusus, atau atas permintaan klinisi, dapat dibuat suatu preparat basah langsung dan dilakukan pulasan Ziehl-Neelsen.

Sediaan apus pulasan Gram

Dengan menggunakan sengkeli bakteriologis, buatlah sediaan apus yang rata dari bagian spesimen yang paling purulen pada kaca objek bersih. Jika hanya tersedia lidi kapas, kaca objek harus disterilkan dahulu dengan dilewatkan pada nyala api lampu Bunsen dan dibiarkan mendingin. Lidi kapas kemudian digulirkan perlahan pada permukaan kaca, tanpa menggosok atau memberi tekanan yang berlebihan. Biarkan sediaan kering di udara, terlindung dari serangga, atau letakkan dalam inkubator. Fiksasi dengan panas, warnai dan periksalah sediaan tersebut dengan objektif minyak emersi (100×). Periksalah dengan teliti dan catat keberadaan dan jumlah (gunakan tanda +):

- granulosit polimorfonuklear (sel pus);
- kokus Gram-positif yang tersusun dalam kelompokan, mengarah pada stafilokokus;
- kokus Gram-positif berbentuk rantai, mengarah pada streptokokus atau enterokokus;
- batang Gram-negatif yang menyerupai koliform (*Eschericia coli*, *Klebsiella*, dll), Enterobacteriaceae lain (*Proteus*, *Serratia*, dll), batang non fermenter (*Pseudomonas* spp.), atau anaerob obligat (*Bacteroides* spp.);

- batang Gram-positif yang besar dan lurus dengan ujung persegi yang sugestif pada *Clostridium perfringens*, agen utama gangren gas, atau *Bacillus anthracis*, penyebab antraks;
- campuran bakteri yang sangat banyak dan pleomorfik, termasuk streptokokus, batang Gram-positif dan Gram-negatif dengan berbagai ukuran, termasuk batang fusiformis (berbentuk kumparan); gambaran demikian sugestif untuk “flora anaerob campuran” dan harus dilaporkan demikian;
- *Candida* atau sel ragi lainnya, yang tampak sebagai bulatan lonjong Gram positif yang bertunas, sering kali membentuk pseudomiselium yang bercabang.

Granula sulfur dari aktinomikosis atau granula dari misetoma harus digerus pada kaca objek, dipulas Gram, dan diperiksa untuk melihat filamen Gram positif yang tipis bercabang dan berfragmen.

Mikroskopi langsung

Jika diminta, atau jika dicurigai suatu infeksi jamur atau parasit, haruslah diperiksa preparat basah. Jika pusnya pekat, satu sengkelit pus harus dicampur dalam satu tetes larutan saline. Untuk mencari jamur, harus digunakan setetes larutan kalium hidroksida 10% untuk menjernihkan spesimen. Pangsanglah kaca tutup dan dengan menggunakan objektif 10× dan 40×, carilah secara khusus adanya:

- amuba yang bergerak aktif dalam aspirat dari suatu abses hati;
- sel-sel ragi *Histoplasma capsulatum* (termasuk varietas Afrika, yaitu var. *duboisii*), *Blastomyces dermatitidis* (di daerah-daerah endemik), *Candida* spp;
- hifa jamur dan filamen bakteri dalam granula yang digerus dari misetoma;
- parasit, seperti mikrofilaria, skoleks atau kait *Echinococcus*, telur *Schistosoma*, *Fasciola*, atau *Paragonimus*.

Pulasan tahan asam (Ziehl-Neelsen)

Pulasan Ziehl-Neelsen harus dikerjakan bila diminta oleh klinisi. Pembuatan sediaan tahan asam juga disarankan jika pus tidak menunjukkan bakteri atau jika hanya tampak batang “korieform” Gram-positif yang berwarna samar pada sediaan apus pulasan Gram. Basil tuberkulosis harus dicurigai khususnya pada pus atau eksudat purulen dari pleura, sendi, abses tulang, atau kelenjar getah bening. Basil tahan asam non-tuberkulosa (yang disebut “atipik”) kadang ditemukan dalam abses gluteus pada lokasi suntikan intramuskular yang dalam. Abses yang demikian seringkali disebabkan oleh mikobakteria yang tumbuh cepat, yang termasuk dalam kelompok *Mycobacterium fortuitum-chelonae*. Di daerah tropis, duh yang dikerok dari dasar ulkus kulit yang nekrotik pada tungkai atau lengan dapat disebabkan oleh batang tahan asam yang tumbuh lambat, yang disebut *M. ulcerans* (ulkus Buruli). *M. marinum* adalah batang tahan asam tuberkulosa lain yang dapat ditemukan dalam lesi nodular ulseratif kronik pada tangan, lengan, dan permukaan kulit lain yang terpajan pada perenang dan nelayan.

Biakan

Jika bakteri atau jamur terlihat pada pemeriksaan mikroskopik, media biakan yang sesuai harus diinokulasi. Tanpa tergantung dari hasil pemeriksaan mikroskopik, semua spesimen pus atau eksudat harus diinokulasikan sedikitnya pada 3 media biakan:

- lempeng agar darah untuk isolasi stafilokokus dan streptokokus;
- lempeng agar MacConkey untuk isolasi batang Gram negatif; dan
- tabung kaldu yang bertindak sebagai media *enrichment* untuk kuman aerob dan anaerob, misalnya, kaldu tioglikolat atau media daging masak.

Ukuran inokulum harus ditentukan berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopik dan dapat bervariasi dari satu sengkelit sampai beberapa tetes. Jika sejumlah besar organisme tampak pada sediaan apus pulasan Gram, spesimen bahkan harus diencerkan dalam sedikit kaldu steril sebelum diinokulasikan pada lempeng agar. Jika digunakan lidi kapas untuk menginokulasi, lidi kapas tersebut harus diusap-

kan pada suatu daerah kecil pada lempeng, dan sisa permukaan digurat dengan sengkelit. Jika lidi kapas tersebut kering, lidi kapas harus dilembabkan dulu dalam sedikit kaldu atau larutan saline steril. Pada semua kasus, teknik inokulasi harus menghasilkan koloni-koloni terpisah untuk identifikasi dan uji kepekaan.

Sebelum inokulasi, lempeng agar darah harus dikeringkan selama 20 menit dalam inkubator untuk meminimalkan risiko pertumbuhan berlebihan *Proteus* spp yang menyebar. Lempeng yang telah diinokulasi harus diinkubasi pada suhu 35° C dalam stoples lilin. Secara rutin, semua media harus diinkubasi selama 2 hari dan dilihat setiap hari untuk mencari pertumbuhan. Jika diminta biakan organisme yang sukar tumbuh, diperlukan inkubasi yang lebih lama (1–2 minggu atau lebih). Jika tampak pertumbuhan dalam kaldu, kaldu harus dipulas dengan Gram dan disubkultur ke media biakan yang sesuai. Media biakan tambahan harus digunakan bila diminta secara khusus, atau jika diindikasikan oleh hasil pemeriksaan mikroskopik, seperti pada contoh berikut:

- Jika tampak stafilokokus, agar garam manitol (*mannitol salt agar*) tambahan berguna untuk mendapatkan pertumbuhan yang murni dan untuk membuat perbedaan awal antara *S. aureus* dan kokus lain.
- Jika ditemukan streptokokus, identifikasinya dapat dipercepat dengan menempatkan cakram basitrasin diferensial pada daerah guratan awal.
- Jika ditemukan ragi atau jamur, spesimen juga harus diinokulasikan pada dua tabung agar dekstroza Sabouraud, satu diinkubasi pada 35° C, satu lagi pada suhu kamar, keduanya diamati sampai satu bulan. (Agar darah cukup untuk isolasi *Candida* spp.).
- Jika didapatkan batang tahan asam pada sediaan yg dipulas Ziehl-Neelsen, inokulasikan 1 sampai 3 tabung media Löwenstein-Jensen. Jika spesimen juga mengandung bakteri yang bukan tahan asam, spesimen harus didekontaminasi lebih dahulu. Mikobakteria yang tumbuh cepat, seperti *M. fortuitum*, mungkin mati oleh proses dekontaminasi. Kuman ini menghasilkan pertumbuhan dalam 3–7 hari pada agar darah dan agar MacConkey. Batang bercabang, filamentosa yang tahan asam sebagian dan berada dalam pus abses pleura atau abses otak kemungkinan besar adalah *Nocardia asteroides*; kuman ini tumbuh pada agar darah dalam beberapa hari.
- Pus dari pasien penderita artritis, pleuritis, osteitis, atau selulitis, khususnya anak yang berusia kurang dari 5 tahun, juga harus diinokulasikan pada lempeng agar coklat untuk mendapatkan *H. influenzae*.
- Diperlukan biakan dalam atmosfer yang benar-benar anaerob adalah jika sediaan Gram menunjukkan flora anaerob campuran dan juga bila spesimen mengeluarkan bau busuk yang khas. Agar darah anaerob juga dibutuhkan untuk pertumbuhan *Actinomyces*. Biakan anaerob akan diminta oleh klinisi bila dicurigai adanya gangren gas oleh *Clostridium*. Metode untuk bakteriologi anaerob dijelaskan pada hal. 91–95.

Identifikasi

Dengan pengecualian pencemar dari lingkungan atau dari kulit (seperti *Staphylococcus epidermidis*), semua organisme yang diisolasi dari luka, pus, atau eksudat harus dianggap bermakna dan diusahakan untuk mengidentifikasinya. Walaupun demikian, tidak selalu diperlukan identifikasi penuh, khususnya pada kasus flora campuran.

Bakteri atau jamur yang diisolasi dari pus dan eksudat dapat di golongankan ke dalam hampir semua kelompok atau spesies. Kriteria identifikasi di sini hanya diberikan untuk stafilokokus yang umumnya menghasilkan pus (piogenik), dan untuk 2 patogen lain, *Pasteurella multocida* dan *Bacillus anthracis*, yang jarang diisolasi dari luka atau infeksi kulit, tetapi sangat penting dalam penatalaksanaan pasien. Pelajarilah buku ajar mikrobiologi klinik yang baku untuk deskripsi lengkap metode identifikasi. Pada setiap kasus, langkah pertama adalah memeriksa koloni yang terpisah dengan teliti, ambil satu koloni untuk tiap jenis, buat sediaan Gram dan kemudian cirikan organisme yang tampak di mikroskop.

Stafilokokus

Stafilokokus adalah bakteri yang paling sering menghasilkan pus. Stafilokokus tumbuh baik secara aerob pada agar darah dan membentuk koloni putih opak atau krem, dengan diameter 1–2 mm setelah inkubasi semalaman. Stafilokokus bersifat unik dalam hal pertumbuhan pada media berkadar garam tinggi, seperti MSA. Stafilokokus dapat dibedakan dengan streptokokus dari morfologi dan dari produksi katalasenya. Produksi katalase stafilokokus ditunjukkan dengan meneteskan setetes hidrogen peroksida 3% pada koloni yang terdapat pada kaca objek bersih. Timbulnya gelembung oksigen merupakan petunjuk adanya produksi katalase.

Untuk kepentingan klinis, stafilokokus dapat dibedakan menjadi stafilokokus yang menghasilkan dan tidak menghasilkan koagulase. Stafilokokus penghasil koagulase meliputi spesies *S. aureus*, yang merupakan spesies terpenting dalam kedokteran. Dari semua spesies yang tidak menghasilkan koagulase (koagulase negatif), hanya dua yang akan dibahas di sini, yaitu *S. epidermidis* dan *S. saprophyticus*.

Walaupun *S. aureus* merupakan bagian dari flora mikroba komensal pada hidung (40% orang dewasa sehat positif), kulit dan saluran cerna, spesies ini menyebabkan impetigo, bisul, abses, infeksi luka, infeksi ulkus dan luka bakar, osteomielitis, mastitis (abses payudara), empiema pleura, piomiositis, sindrom syok toksik, dan jenis-jenis infeksi piogenik lainnya.

S. epidermidis juga merupakan komensal umum pada kulit, hidung, dan selaput lendir lainnya, dan mempunyai patogenisitas yang sangat rendah. Walaupun demikian, keberadaannya dalam pus jangan selalu dianggap sebagai kontaminan kulit. Sekalipun kemampuan infeksiya rendah, *S. epidermidis* dapat menyebabkan infeksi kulit pada lokasi kateter, kanul, atau alat lain yang lama dipakai. Infeksi *S. epidermidis* khususnya menyulitkan dalam pembedahan jantung dan ortopedi yang melibatkan insersi alat-alat prostetik (katup jantung buatan atau pinggul buatan).

S. saprophyticus dikenal sebagai penyebab umum infeksi saluran kemih pada wanita muda, kedua setelah *E. coli* pada beberapa populasi.

Ciri khas ketiga spesies utama Staphylococcus dapat dilihat pada Tabel 22. Diagram alur untuk identifikasi awal stafilokokus ditunjukkan pada Gbr. 10.

Karena pentingnya uji koagulase dalam identifikasi *S. aureus*, uji ini dijabarkan secara rinci dalam buku ini. Koagulase adalah enzim yang menyebabkan plasma menggumpal. Koagulase stafilokokus terdapat dalam dua bentuk: koagulase terikat atau faktor penggumpal, yang ditunjukkan dengan uji kaca obyek, dan koagulase bebas, yang ditunjukkan dengan uji tabung.

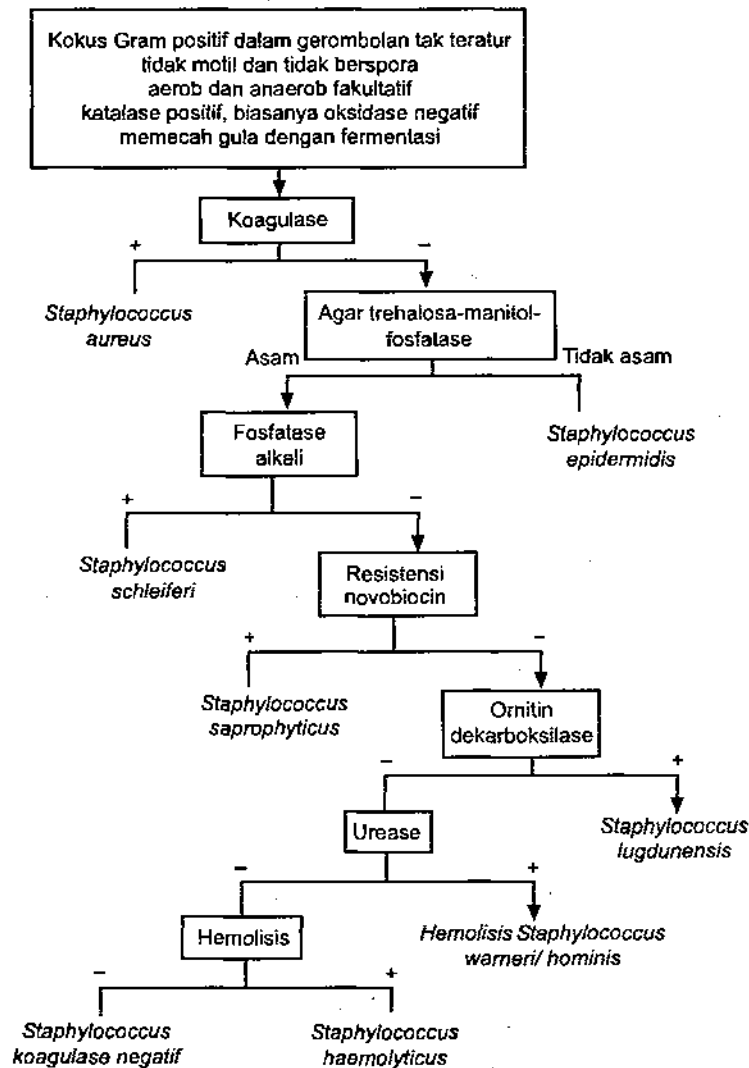
Tabel 22. Perbedaan spesies Staphylococcus yang penting dalam kedokteran

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Produksi koagulase	ya	tidak	tidak
Pengasaman manitol pada agar garam manitol ^a	asam (kuning)	netral (merah)	asam (kuning)
Pigmen koloni ^a	kelabu, kram, atau kuning	putih	putih
Kepekaan in vitro terhadap novobiocin	peka	peka	resisten ^b
Agar DNase	ya	tidak	tidak

^a Dapat ditemukan pengecualian

^b Zone hambatan kurang dari 16 mm dengan menggunakan cakram 5 µg pada metode difusi cakram yang dibakukan.

Gambar 10. Diagram alur untuk identifikasi awal spesies *Staphylococcus* pada manusia



- **Uji kaca objek.** Pada kaca objek bersih, emulsikan satu atau beberapa koloni stafilokokus yang serupa dalam setetes larutan saline. Suspensi tersebut harus cukup pekat. Celupkan sengkelit lurus ke dalam plasma dan gunakan sengkelit ini untuk mengaduk suspensi bakteri. Perhatikan terjadinya penggumpalan dalam waktu 10 detik. Uji kaca objek yang hasilnya negatif palsu terjadi pada sekitar 10% galur *S. aureus*. Jika uji kaca objek negatif untuk isolat yang tampaknya patogenik menurut dasar pertimbangan lainnya (pigmen, sumber klinis), isolat tersebut harus diperiksa ulang dengan uji tabung.
- **Uji tabung.** Teteskan beberapa tetes (0,5 ml) plasma ke dalam tabung reaksi steril berukuran 12 × 75 mm, dan tambahkan 2 tetes biakan murni dalam kaldu. Dapat juga dibuat suspensi dengan kepekatan yang setara langsung dari pertumbuhan pada agar darah. Inkubasi tabung pada suhu 35° C selama 4–18 jam dan kemudian periksa adanya penggumpalan.

Plasma yang digunakan dalam uji koagulase dapat berupa plasma manusia atau plasma kelinci segar yang dicampur dengan asam etilendiamin tetraasetat (EDTA). Plasma harus disimpan dalam lemari pendingin dalam jumlah kecil (1 ml) dan hasilnya dibandingkan dengan biakan *S. aureus* dan *S. epidermidis*, yang dikerjakan bersamaan.

Pasteurella multocida

Beberapa basil Gram negatif ditularkan melalui gigitan hewan dan dapat menyebabkan infeksi berat pada manusia, tersering yaitu *Pasteurella multocida*. *P. multocida* adalah bakteri komensal yang ditemukan dalam flora normal mulut pada banyak hewan. Luka gigitan yang terinfeksi oleh *P. multocida* dapat menyebabkan selulitis luas, yang dapat meluas ke sendi, menyebabkan artritis. Osteomyelitis, bakteremia, dan bahkan meningitis pernah juga dilaporkan.

P. multocida harus dicari khususnya dalam cairan luka yang diketahui atau dicurigai berasal dari gigitan hewan. *P. multocida* adalah kokobasil Gram-negatif yang sangat kecil dan nonmotil. Kuman ini tumbuh baik di agar darah pada suhu 35° C, tetapi dihambat sepenuhnya oleh garam empedu yang terkandung dalam media selektif enterik, misalnya agar MacConkey. Setelah inkubasi semalam-an, agar darah ditumbuhi oleh koloni-koloni yang kecil, non-hemolitik, translusen, dan mukoid (karena terdapatnya kapsul pada bentuk yang virulen).

Identifikasi biokimia didasarkan pada ciri-ciri berikut.

- fermentasi glukosa tanpa pembentukan gas: *P. multocida* tumbuh pada *Kligler iron* agar dengan pengasaman puntung;
- uji oksidase positif lemah;
- katalase positif;
- nitrat direduksi menjadi nitrit (0,1% kalium nitrat dalam kaldu'nutrien);
- urease negatif;
- indol positif—uji dalam kaldu *tryptic soy* (TSB) atau MIU setelah inkubasi 48 jam;
- sangat sensitif terhadap bensilpenisilin pada uji kepekaan metode cakram.

Bacillus anthracis

Genus *Bacillus* terdiri dari banyak spesies batang Gram-positif aerobik yang membentuk spora, yang tersebar luas dalam tanah. Spesies *B. anthracis* berperan penting bagi kesehatan masyarakat dalam hal infeksi kulit. Spesies lain, jika terisolasi dari luka atau pus, umumnya merupakan pencemar, atau paling-paling merupakan oportunist.

B. anthracis adalah patogen utama pada ternak sapi, domba, kambing, dan hewan peliharaan lain. Kuman ini juga menyerang hewan liar. Antraks dapat menyerang manusia, khususnya orang-orang di berbagai bagian Afrika dan Asia yang bekerja atau hidup dalam kontak erat dengan ternak. Infeksi manusia dapat juga berasal dari produk hewani yang mengandung spora antraks, seperti wol, kulit, bulu binatang dan tulang.

Bentuk infeksi manusia yang paling umum adalah antraks kulit, yang dapat memburuk menjadi septikemia dan meningitis. Spora memasuki kulit yang rusak dan menghasilkan lesi vesikular dengan pusat nekrotik yang dikelilingi oleh edema yang luas ("pustul maligna"). Batang Gram-positif besar dengan ujung persegi, berkapsul, dan tanpa spora ditemukan dalam sedimen apus dari cairan vesikel.

B. anthracis tumbuh secara aerobik. Pada agar darah kuman ini menghasilkan koloni besar yang datar dan berwarna kelabu, berdiameter sampai 5 mm, dengan tekstur permukaan kasar dan tepi iregular yang menunjukkan pertumbuhan keluar seperti rambut (kepala Medusa). Pada tahap ini perlu dibedakan *B. anthracis* yang sangat patogenik dari spesies saprofitik yang umumnya tidak berbahaya.

Pembedaan awal harus didasarkan pada tidak adanya hemolisis, sensitivitas terhadap bensilpenisilin, dan tidak adanya motilitas pada *B. anthracis*. Sebaliknya, sebagian besar spesies *Bacillus* yang saprofitik bersifat motil dan sangat hemolitik. Ketiga ciri tersebut dapat menjadi dasar identifikasi presumtif. Untuk diagnosis definitif, biakan murni isolat tersebut harus segera dikirimkan ke laboratorium kedokteran hewan atau kesehatan masyarakat pusat.

B. anthracis adalah organisme yang sangat menular maka spesimen dan biakan harus ditangani dengan sangat hati-hati untuk mencegah pencemaran lingkungan serta infeksi pada petugas laboratorium.

Uji kepekaan

Obat antimikroba tidak selalu diperlukan untuk penatalaksanaan pasien dengan luka, abses, atau eksudat. Insisi bedah, drainase, dan debridemen yang baik umumnya lebih penting daripada obat antimikroba. Walaupun demikian, hasil uji kepekaan harus diusahakan ada dalam 48 jam setelah penerimaan spesimen.

Uji kepekaan rutin jangan dikerjakan pada bakteri yang mempunyai pola kepekaan yang telah diketahui, misalnya streptokokus, *Pasteurella*, dan *Actinomyces*, yang hampir tanpa kecuali sensitif terhadap bensilpenisilin.

Untuk Enterobacteriaceae, batang Gram-negatif non-fermenter dan stafilokokus, harus digunakan uji difusi cakram yang dibakukan (Kirby-Bauer). Hanya obat antimikroba yang saat ini sering digunakan oleh dokter peminta yang diujikan. Obat antimikroba yang baru dan mahal hanya diuji (atau dilaporkan) bila diminta secara khusus, atau bila isolat tersebut resisten terhadap obat-obat lain.

Pada pengujian kepekaan stafilokokus, *S. aureus* maupun *S. epidermidis*, sering dijumpai masalah. Lebih dari 80% isolat, bahkan yang berasal dari komunitas, menghasilkan β -laktamase serta resisten terhadap bensilpenisilin dan ampicilin. Infeksi yang disebabkan oleh stafilokokus yang resisten terhadap bensilpenisilin sering kali diobati dengan penisilin yang resisten terhadap β -laktamase dari golongan metisilin (oksasilin, kloksasilin, dll.). Cakram oksasilin (1 μ g) saat ini dianjurkan untuk pengujian kepekaan terhadap kelompok ini. Cakram oksasilin bersifat stabil, dan cenderung mendeteksi resistensi terhadap semua anggota golongan. Resistensi ini sering dari jenis heteroresisten, yaitu hanya melibatkan sebagian dari populasi bakteri. Oleh karena heteroresistensi stafilokokus lebih mudah dikenali pada suhu rendah, suhu inkubator janganlah melebihi 35° C. Galur yang heteroresisten menunjukkan lapisan pertumbuhan berkabut atau banyak koloni-koloni kecil di dalam zona inhibisi yang jelas, yang sering kali dikategorikan sebagai pencemar. Jika tampak pertumbuhan semacam itu, diindikasikan sediaan apus pulasan Gram untuk menyingkirkan kemungkinan kontaminasi.

Galur heteroresisten secara klinis resisten terhadap semua antimikroba β -laktam termasuk sefalosporin, karbapenem, dan golongan metisilin. Oleh karena itu, stafilokokus tidak perlu diuji kepekaannya terhadap sefalosporin. Terdapat resistensi silang yang sempurna antara bensilpenisilin dan ampicilin. Oleh karena itu, kepekaan stafilokokus terhadap ampicilin jangan diuji secara terpisah.

Bakteriologi anaerob

Pendahuluan

Buku pegangan ini seringkali merujuk pada bakteri anaerob dan infeksi bakteri anaerob. Infeksi bakteri anaerob dapat terjadi hampir di semua jaringan dan lokasi tubuh pada kondisi yang memungkinkan.

Sebagian besar penyakit bakteri anaerob disebabkan oleh bakteri endogen yang merupakan bagian dari flora normal tubuh dan sama sekali tidak mengganggu kesehatan sampai terjadi sesuatu yang mengganggu keseimbangan flora normal, atau yang memungkinkan aliran bakteri dari satu lokasi anatomik ke lokasi anatomik lain. Bakteri anaerob eksogen, terutama *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, dan kadang-kadang *C. perfringens*, serta spesies klostroidium lainnya dapat masuk melalui luka, menyebabkan tetanus, luka dengan toksin botulisme, atau gangren gas. Abses pada hampir semua organ, bakteremia, peritonitis, empiema torakal, selulitis, dan apendisitis hanyalah sejumlah yang proses penyakitnya banyak dipengaruhi oleh bakteri anaerob. Oleh karena itu penting bagi ahli mikrobiologi untuk mengetahui kapan dan bagaimana membiakkan bakteri anaerob dalam spesimen klinis tertentu.

Deskripsi bakteri sehubungan dengan kebutuhan oksigen

Berikut ini merupakan penjabaran yang mungkin terlalu sederhana tetapi dapat diterima secara operasional mengenai bakteri-bakteri yang penting dalam bidang kedokteran berdasarkan kebutuhan oksigennya.

- *Bakteri aerob obligat* memerlukan oksigen dalam bentuk gas untuk menyempurnakan siklus penghasil energinya; organisme-organisme ini tidak dapat tumbuh tanpa sumber oksigen. Contoh bakteri aerob obligat adalah *Micrococcus* spp. dan *Nocardia asteroides*.
- *Bakteri anaerob obligat* tidak memerlukan oksigen untuk aktivitas metaboliknya, bahkan oksigen bersifat toksik bagi banyak bakteri tersebut. Energi berasal dari reaksi fermentasi, yang mungkin menghasilkan produk akhir berbau busuk. Contoh bakteri anaerob adalah *Bacteroides fragilis* dan *Peptostreptococcus magnus*.
- *Bakteri anaerob fakultatif* adalah bakteri yang tidak mutlak memerlukan oksigen untuk pertumbuhan atau produksi energi; bakteri-bakteri ini dapat menggunakan oksigen atau tumbuh dengan mekanisme anaerobik. Bakteri semacam ini biasanya mudah menyesuaikan diri dengan lingkungannya, serta mampu menghasilkan energi untuk tumbuh dan berkembangbiak dengan mekanisme yang paling efektif. *E. coli* dan *S. aureus* adalah contoh organisme anaerob fakultatif.

Selain yang telah disebutkan di atas, ada *bakteri mikroaerofilik* yang tumbuh paling baik pada kadar oksigen yang rendah. *Campylobacter jejuni* adalah salah satu contoh bakteri mikroaerofilik.

Bakteriologi

Empat kelompok utama bakteri anaerob bertanggung jawab bagi sekitar 80% infeksi anaerob yang terdiagnosis. Keempat kelompok tersebut adalah *Bacteroides*, *Prevotella* dan *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., serta *Clostridium* spp. Spesies yang paling sering ditemukan pada tiap genus adalah: *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus magnus* serta *Clostridium perfringens*. Metode spesifik untuk isolasi dan identifikasi ketiga genus dan spesies tersebut juga harus bertindak sebagai model untuk isolasi dan memulai proses identifikasi bakteri anaerob lain yang penting secara klinis.

Pengambilan spesimen dan pengirimannya ke laboratorium

Topik ini telah dibahas secara menyeluruh dalam bagian-bagian sebelumnya. Lidi kapas harus dihindari dalam pengambilan spesimen karena bakteri anaerob sangat sensitif terhadap udara dan pengeringan. Spesimen untuk biakan kuman anaerob harus diambil dengan hati-hati dari lokasi infeksi yang aktif. Jasa ahli bedah mungkin diperlukan untuk pengambilan beberapa spesimen. Ini khususnya terjadi pada aspirasi pus dengan jarum, pengambilan spesimen jaringan dan/ atau pus dari luka terinfeksi, empiema atau abses yang mengalir.

Spesimen harus ditempatkan dalam penampung steril yang tertutup rapat, atau jika tidak tersedia penampung semacam itu, keseluruhan spesimen hasil aspirasi harus dibawa segera ke laboratorium di dalam semprit dengan jarum yang tertutup atau dilindungi dengan tutup karet.

Membuat lingkungan anaerob untuk inkubasi biakan

Ada berbagai metode untuk menciptakan lingkungan anaerob. Salah satu yang mudah dan murah adalah penggunaan stoples anaerob (*anaerobic jar*) yang terbuat dari kaca tebal atau polikarbonat, berkapasitas 2,5–3,5 liter, dilengkapi dengan tutup kedap udara yang rapat, yang dapat dilepas dan dipasang dengan mudah. Setelah meletakkan cawan Petri yang telah diinokulasikan ke dalam stoples, atmosfer anaerob dibuat dengan memasukkan alat penghasil anaerobiosis sekali pakai yang tersedia di pasaran, dan menutup tutup stoples. Alat sekali pakai untuk menimbulkan anaerobiosis berbentuk amplop *foil* datar bersegel, yang melepaskan hidrogen dan karbondioksida setelah penambahan air. Walaupun demikian, alat ini membutuhkan katalis palladium yang dipasang pada sisi bawah tutup stoples. Katalis menjadi tidak aktif selama pemakaian dan harus diregenerasi atau diganti secara teratur, sebagaimana dianjurkan oleh pabrik pembuat. Tersedia carik indikator-redoks sekali pakai, yang akan berubah dari warna biru (atau merah) menjadi tidak berwarna dalam atmosfer anaerob, dari sejumlah pabrik pembuat.

Tabung berisi biakan kaldu untuk anaerob, seperti kaldu thioglikolat atau kaldu daging yang dimasak tidak perlu diinkubasi pada keadaan anaerob, karena formulasinya mengandung zat pereduksi yang akan menciptakan lingkungan anaerob. Jika volume kaldu mencukupi (10–12 ml per tabung tutup ulir standar berdiameter 15 mm) dan media baru dibuat, kondisi anaerob dihasilkan di bagian bawah tabung. Jika tidak digunakan pada hari kaldu dibuat, tabung harus diregenerasi dengan tutup ulir, dilonggarkan selama sekitar 15 menit dalam *water-bath* mendidih untuk membuang oksigen terlarut, kemudian tutup ulir dieratkan dan media dibiarkan mendingin sebelum inokulasi.

Media biakan anaerob

Biakan anaerob harus dilakukan hanya bila diminta oleh klinisi, jika spesimen berbau busuk, atau jika hasil sediaan apus pulasan Gram menunjukkan kemungkinan infeksi anaerob, misalnya terdapat flora pleomorfik campuran batang dan kokus Gram positif dan Gram negatif, batang Gram negatif berbentuk kumparan, atau batang Gram positif tebal berujung persegi yang kemungkinan adalah *Clostridium*.

Biakan anaerob rutin jangan dikerjakan untuk urin, sekret genital, feses, atau sputum yang dibatukkan; adanya bakteri anaerob dalam spesimen-spesimen tersebut menunjukkan kontaminasi oleh flora komensal normal dari lokasi spesimen bersangkutan. Klinisi harus diberitahu bahwa spesimen yang mengandung flora normal tidak dapat diterima untuk biakan anaerob, kecuali ada alasan pembenaran yang kuat.

Agar darah biasa merupakan media lempeng yang baik untuk isolasi patogen-patogen anaerob yang terpenting. Untuk isolasi spesies yang lebih sukar tumbuh, disarankan menggunakan agar darah dasar yang diperkaya dengan faktor-faktor pertumbuhan (hemin dan menadion). Dasar agar yang demikian tersedia secara komersial sebagai agar anaerob Wilkins-Chalgren.

Bakteri anaerob sering menjadi bagian dari mikroflora yang kompleks, yang juga melibatkan organisme aerob, agar darah anaerob dapat dibuat selektif dengan penambahan salah satu atau lebih dari satu antimikroba yang spesifik. Sebagai contoh, penambahan aminoglikosida (neomisin, kanamisin) dengan konsentrasi akhir 50 µg/ml menghambat sebagian besar bakteri aerob dan fakultatif. Larutan aminoglikosida dibuat dengan melarutkan 500 mg dalam 100 ml air suling. Lelehkan 100 ml dasar agar anaerob dan pada saat sudah mendingin sampai suhu 56° C, tambahkan 5 ml darah yang telah mengalami defibrinasi dan 1 ml larutan antibiotik secara aseptik. Campur rata, dan tuangkan sekitar 15–18 ml ke cawan Petri steril secara aseptik. Lempeng agar ini harus digunakan sesegera mungkin atau disimpan dalam lemari pendingin, lebih baik dalam kantung plastik atau sarung plastik.

Prosedur inokulasi dan isolasi

Ke dalam media-media berikut, pesimen dari infeksi anaerob yang dicurigai harus diinokulasikan tanpa penundaan:

- agar darah anaerob untuk diinkubasi dalam stoples anaerob;
- agar darah aerob untuk diinkubasi dalam stoples lilin;
- satu lempeng agar MacConkey;
- satu tabung kaldu anaerob (thioglikolat atau daging yang dimasak).

Biakan aerob harus diinokulasi dan diproses sebagaimana biasa dan diperiksa setelah 24 dan 48 jam untuk mencari organisme aerob dan fakultatif. Suatu daerah kecil pada agar darah anaerob harus diinokulasi dan inokulumnya diguratkan dengan sengkelit. Lempeng agar harus diinkubasi dan stoples anaerob dibuka setelah 48 jam untuk inspeksi. Jika pertumbuhan tidak mencukupi, lempeng agar dapat diinkubasi kembali selama 24 atau 48 jam. Biakan kaldu harus diinokulasikan dalam jumlah yang banyak menggunakan pipet Pasteur sehingga inokulum tersebar rata pada keseluruhan media dalam tabung.

Setelah 48 jam, pertumbuhan pada agar darah anaerob harus dilihat dan dibandingkan dengan pertumbuhan pada media agar aerob. Tiap jenis koloni harus diperiksa dengan pulasan Gram. Bakteri dengan gambaran mikroskopik sama yang tumbuh pada agar aerob dan anaerob dianggap sebagai anaerob fakultatif. Koloni yang tumbuh hanya pada agar anaerob kemungkinan besar mengandung kuman anaerob dan harus dilakukan subkultur pada dua lempeng agar darah, satu diinkubasi secara anaerob dan satunya dalam stoples lilin. Jika pertumbuhan hanya tampak pada anaerobiosis, harus dicoba untuk mengidentifikasi biakan murni kuman anaerob tersebut.

Jika tampak pertumbuhan di dasar kaldu anaerob, pertumbuhan ini harus di-subkultur ke agar darah aerob dan anaerob dan diperiksa dengan cara yang sama seperti lempeng biakan primer. Oleh karena biakan cair diinokulasi dengan pus dalam jumlah yang lebih banyak, biakan cair mungkin positif walaupun lempeng agar primer tetap steril.

Identifikasi kuman anaerob yang penting dalam kedokteran

Kelompok Bacteroides fragilis

Kelompok ini mencakup beberapa spesies yang merupakan flora normal usus dan vagina. Kuman-kuman ini sering terlibat dalam infeksi campuran pada abdomen dan pelvis dan dapat juga menyebabkan bakteremia. *B. fragilis* adalah batang Gram negatif yang tidak motil, seringkali menunjukkan sedikit pleomorfisme, tumbuh cepat pada agar darah anaerob. Setelah 48 jam, koloni berukuran sedang (berdiameter sampai 3 mm), translusen, kelabu-putih, dan non-hemolitik. Identifikasi cepat dimungkinkan dengan uji stimulasi empedu. Biakan murni organisme yang dicurigai diinokulasikan di dasar 2 tabung kaldu thioglikolat; salah satu tabungnya mengandung 20% (2 ml dalam 10 ml) empedu sapi steril (yang telah diotoklaf). Setelah inkubasi 24 jam, pertumbuhan dalam kedua tabung dibandingkan: pertumbuhan *B. fragilis* terstimulasi secara nyata dalam kaldu yang diberi tambahan empedu.

Clostridium perfringens

Genus *Clostridium* terdiri dari banyak spesies batang Gram positif yang membentuk spora, beberapa di antaranya termasuk dalam flora normal usus sedangkan yang lainnya ditemukan dalam debu dan tanah. Spesies yang paling penting secara klinis adalah *C. perfringens*. bakteri ini umumnya berkaitan dengan gangren gas dan dapat pula menyebabkan bakteremia dan infeksi dalam lainnya. Berbeda dengan sebagian besar spesies *Clostridium* lain, *C. perfringens* tidak motil dan tidak membentuk spora dalam jaringan terinfeksi atau dalam biakan muda.

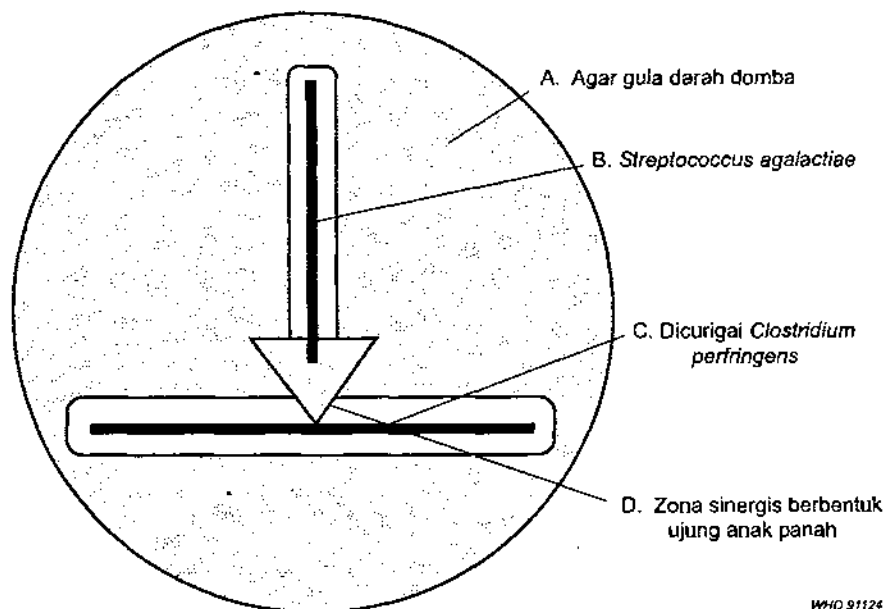
C. perfringens tumbuh cepat dalam kaldu anaerob dan menghasilkan banyak gas. Pada agar darah anaerob, tampak koloni-koloni berukuran sedang (2–3 mm) setelah 48 jam. Sebagian besar galur menghasilkan zona hemolisis ganda: zona hemolisis sempurna yang bening di bagian dalam, dan zona hemolisis parsial di bagian luar.

Identifikasi cepat dimungkinkan dengan uji CAMP terbalik (*reverse CAMP*)¹, yang dikerjakan sebagai berikut (lihat Gbr. 11):²

1. Siapkan lempeng agar darah dengan 5% darah domba yang telah dicuci 3 kali.
2. Guratkan biakan murni *Streptococcus agalactiae* sepanjang garis tengah lempeng. Guratkan biakan *Clostridium* yang dicurigai dalam garis yang tegak lurus, tetapi tidak menyentuh *S. agalactiae* tersebut.
3. Inkubasi dalam stoples anaerob selama 24 jam.

C. perfringens membentuk daerah hemolisis yang lebih tegas berbentuk mata-panah pada perbatasan kedua guratan. *Clostridium* dengan uji CAMP terbalik yang negatif dapat dilaporkan sebagai "*Clostridium* spp. bukan *C. perfringens*".

Gambar 11. Uji CAMP terbalik



¹ Uji CAMP terbalik: dinamakan menurut Christy, Adkins dan Munch-Peterson yang pertama kali melaporkan reaksi ini pada streptokokus grup B.

² Hansen MV & Elliot LP. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. *Journal of clinical microbiology*, 1980, 12: 617-619.

Peptostreptococcus

Beberapa spesies kokus Gram positif anaerob obligat termasuk dalam flora komensal saluran napas, cerna, dan urogenital. Mereka terlibat dalam abses anaerob, infeksi luka dan bahkan bakteremia, umumnya bersama bakteri aerob atau anaerob lain. Pertumbuhan kokus anaerob dalam media laboratorium biasanya lebih lambat daripada *Bacteroides* atau *Clostridium* dan koloni-koloninya biasanya tidak tampak pada agar darah sampai setelah inkubasi 48 jam.

Identifikasi spesies tidak diperlukan dalam bakteriologi rutin. Kokus Gram-positif yang menghasilkan koloni putih cembung kecil pada agar darah anaerob, tetapi tidak tumbuh dalam kondisi aerob, dapat secara presumtif diidentifikasi sebagai *Peptostreptococcus* spp.

Uji kepekaan antimikroba

Uji kepekaan antimikroba jangan dikerjakan secara rutin untuk bakteri anaerob, dengan pertimbangan bahwa uji difusi cakram yang telah baku saat ini kurang disetujui.

Sebagian besar infeksi anaerob disebabkan oleh bakteri yang sensitif terhadap penisilin, dengan pengecualian infeksi yang berasal dari saluran cerna atau vagina. Infeksi demikian umumnya mengandung *Bacteroides fragilis*, yang menghasilkan β -laktamase dan resisten terhadap penisilin, ampicilin, dan sebagian besar sefalosporin. Infeksi semacam ini dapat diobati dengan klindamisin, metronidazol, atau kloramfenikol. Golongan aminoglikosida dan kuinolon tidak aktif terhadap kuman anaerob, tetapi sering digunakan untuk pengobatan pasien dengan infeksi campuran, karena efektivitasnya terhadap bakteri aerob, yang sering kali merupakan bagian dari flora yang kompleks tersebut.

Uji kepekaan antimikroba

Pendahuluan

Dalam suatu pertemuan yang diselenggarakan oleh WHO di Jenewa tahun 1977,¹ dinyatakan keprihatinan mengenai meningkatnya resistensi antibiotika di seluruh dunia yang dikaitkan dengan penggunaan antimikroba pada manusia maupun hewan yang makin meningkat dan sering sembarangan. Dalam tahun-tahun belakangan ini, bakteri yang resisten terhadap obat telah menyebabkan beberapa wabah infeksi yang serius, dengan banyak kematian. Hal ini menyebabkan perlunya program surveilans nasional dan internasional untuk memantau resistensi antimikroba pada bakteri, dengan uji kepekaan menggunakan metode yang dapat dipercaya dan menghasilkan data yang sebanding. Ketersediaan informasi mikrobiologis dan epidemiologis akan membantu klinisi dalam memilih obat antimikroba yang paling sesuai untuk pengobatan infeksi mikroba.

Jika prediksi diharapkan sah, uji kepekaan harus dikerjakan dengan metode yang akurat dan teliti, yang hasilnya harus dapat diterapkan langsung pada keadaan klinis. Kriteria utama ketepatan metode uji kepekaan adalah korelasinya dengan respon pasien terhadap terapi antimikroba.

Pertemuan WHO tersebut menilai bahwa teknik modifikasi difusi cakram Kirby-Bauer,² yang persyaratannya telah ditetapkan oleh WHO pada tahun 1976, dapat direkomendasikan untuk tujuan klinis dan surveilans dengan mempertimbangkan kesederhanaan teknik dan ketelitiannya. Metode ini terutama cocok digunakan untuk bakteri yang termasuk famili Enterobacteriaceae, tetapi metode ini juga dapat direkomendasikan sebagai metode serbaguna bagi semua patogen yang tumbuh cepat. Metode ini telah disesuaikan untuk bakteri-bakteri sukar tumbuh (*fastidious*) yang paling penting secara klinis, tetapi tidak untuk anaerob obligat dan mikobakteria. Oleh karena itu, dianjurkan bahwa rincian uji ini disediakan bagi pekerja laboratorium.³

Prinsip umum pada uji kepekaan antimikroba

Uji kepekaan antimikroba mengukur kemampuan zat antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri *in vitro*. Kemampuan ini dapat diperkirakan melalui metode pengenceran atau difusi.

Uji pengenceran

Untuk pengukuran kuantitatif aktivitas antimikroba, pengenceran antimikroba dapat digabungkan ke dalam kaldu atau media agar, yang kemudian diinokulasi dengan organisme yang diuji. Konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan setelah inkubasi semalaman disebut konsentrasi hambatan minimum/KHM (*minimum inhibitory concentration/ MIC*) zat tersebut. Untuk menilai kemungkinan respons klinis obat, nilai KHM ini kemudian dibandingkan dengan konsentrasi obat yang diketahui tercapai dalam serum dan cairan tubuh lainnya.

¹ *Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant enterobacteria*. Geneva, World Health Organization, 1978 (WHO Technical Report Series, no. 624).

² *WHO Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-eighth report*. Geneva, World Health Organization, 1977 (WHO Technical Report Series, no. 610).

³ Suatu metode yang dapat dibandingkan, yang didasarkan pada prinsip yang serupa dan persyaratan kendali mutu seperti metode Kirby-Bauer, yaitu metode NEO-SENSITABS, yang dihasilkan oleh ROSCO Diagnostica, Taastrup, Denmark. Metode ini menggunakan tablet antimikroba berdiameter 9 mm, yang diberi kode warna sebagai pengganti cakram kertas. Tablet tersebut memberikan hasil dengan stabilitas yang luar biasa dan masa simpan selama empat tahun, bahkan pada suhu ruang. Stabilitas yang tinggi ini sangat penting untuk laboratorium di negara-negara tropis.

Uji difusi

Cakram kertas yang diresapi antibiotika dalam jumlah tertentu, diletakkan pada media agar yang telah ditanami organisme uji secara merata. Suatu gradien konsentrasi zat antimikroba yang terbentuk oleh difusi dari cakram dan pertumbuhan organisme uji dihambat pada suatu jarak dari cakram yang terkait dengan kepekaan organisme, di samping faktor-faktor lain.

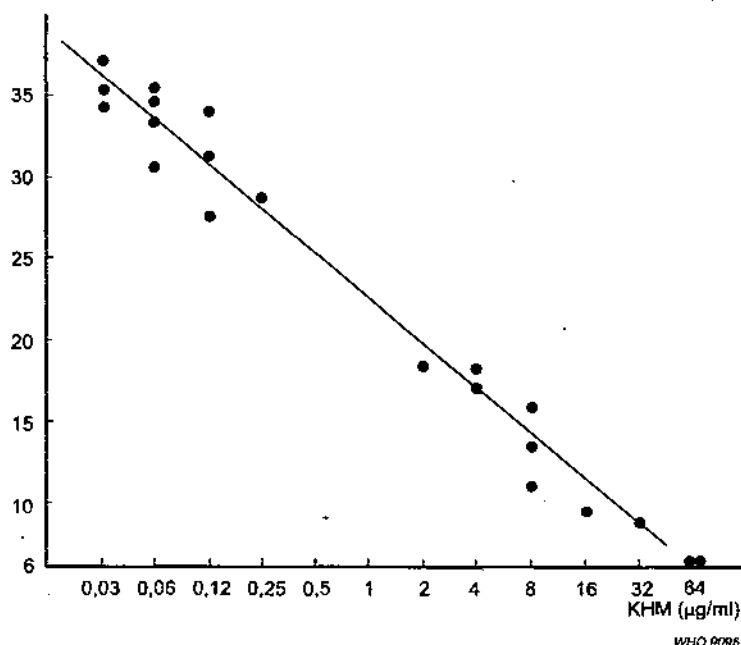
Terdapat hubungan yang hampir linear antara log KHM, sebagaimana diukur dengan uji dilusi, dan dengan diameter zona inhibisi pada uji difusi. Garis regresi yang menggambarkan hubungan ini dapat diperoleh dengan menguji sejumlah besar galur dengan kedua metode tersebut secara paralel (lihat Gbr. 12 dan 13).

Definisi klinis istilah "resisten" dan "peka": sistem tiga kategori

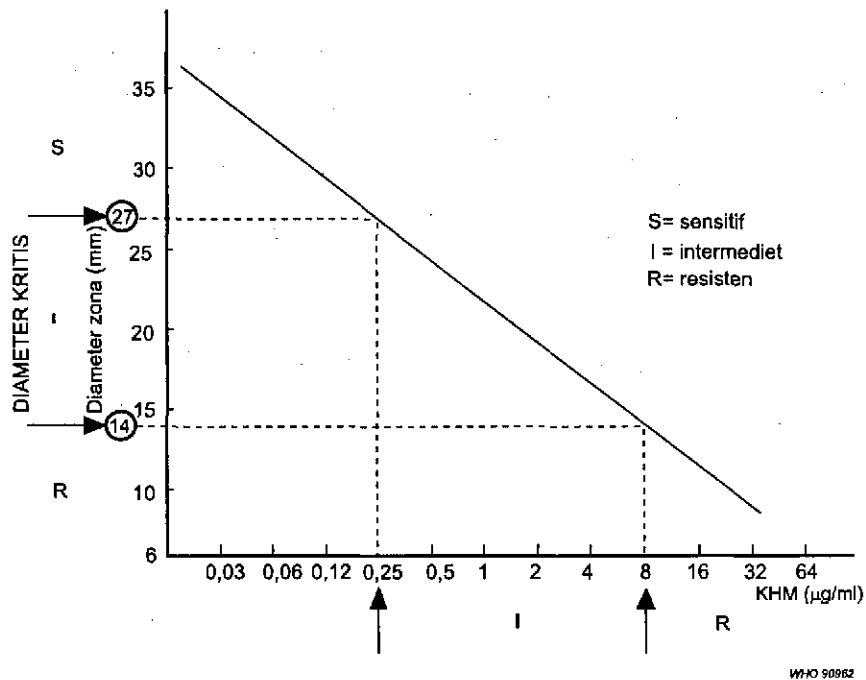
Hasil uji kepekaan, sebagaimana yang dilaporkan kepada klinisi, adalah penggolongan mikroorganisme tersebut ke dalam salah satu dari dua kategori kepekaan atau lebih. Sistem yang paling sederhana hanya terdiri atas dua kategori: sensitif dan resisten. Klasifikasi ini, walaupun mempunyai banyak keuntungan untuk tujuan statistik dan epidemiologis, terlalu kaku untuk digunakan oleh klinisi. Oleh karena itu, sering kali digunakan klasifikasi tiga kategori. Metode Kirby-Bauer dan modifikasinya menggunakan tiga kategori kepekaan, klinisi dan pekerja laboratorium harus memahami definisi yang tepat serta kepentingan klinis kategori-kategori tersebut.

- *Sensitif*. Suatu organisme disebut "sensitif" terhadap suatu antimikroba bila infeksi yang disebabkan olehnya cenderung merespon pengobatan dengan antimikroba ini pada dosis yang dianjurkan.
- *Kepekaan intermediet* mencakup dua keadaan. Ini dapat diterapkan pada galur-galur yang "peka sedang" terhadap suatu antimikroba yang dapat digunakan untuk pengobatan dengan dosis yang

Gambar 12. Grafik hubungan antara log₂KHM dan diameter zona inhibisi yang didapatkan dengan uji difusi menggunakan cakram yang mengandung zat antimikroba konsentrasi tunggal



Gambar 13. Interpretasi ukuran zona sebagai sensitif, intermediet dan resisten berdasarkan hubungannya dengan KHM



lebih tinggi (misalnya, β -laktam) karena toksisitasnya yang rendah, atau karena zat antimikroba tersebut terkonsentrasi pada fokus infeksi (misalnya, urin).

Klasifikasi ini juga berlaku untuk galur-galur yang menunjukkan "kepekaan intermediet" terhadap antimikroba yang lebih toksik (misalnya, aminoglikosida) yang tidak dapat digunakan dengan dosis yang lebih tinggi. Pada keadaan ini, kategori intermediet berperan sebagai zona penyangga (*buffer zone*) antara sensitif dan resisten.

Karena banyak klinisi tidak biasa dengan perbedaan yang halus antara kepekaan intermediet dengan moderat, walaupun penting secara klinis, banyak laboratorium yang menggunakan istilah "intermediet" untuk pelaporan.

- **Resisten.** Istilah ini menunjukkan bahwa organisme diperkirakan tidak berespon terhadap antimikroba tersebut, tanpa memandang dosis dan lokasi infeksi.

Dalam situasi tertentu, misalnya pengujian respon stafilokokus terhadap bensilpenisilin, hanya dikenal kategori "sensitif" dan "resisten" (berhubungan dengan produksi β -laktamase).

Keputusan akhir penggunaan antimikroba tertentu, dan dosis yang diberikan, akan tergantung bukan saja pada hasil uji kepekaan, tetapi juga interpretasinya oleh dokter. Faktor-faktor lain, seperti kepentingan patogenik mikroorganisme tersebut, efek samping dan sifat-sifat farmakokinetik obat, difusinya pada lokasi tubuh yang berbeda, serta status kekebalan pejamu, juga harus dipertimbangkan.

Indikasi uji kepekaan rutin

Uji kepekaan dapat dikerjakan di laboratorium klinis untuk dua tujuan utama:

- menuntun klinisi dalam memilih obat antimikroba terbaik bagi pasien perorangan;
- mengumpulkan informasi epidemiologis mengenai resistensi mikroorganisme yang penting untuk kesehatan masyarakat dalam komunitas tersebut.

Uji kepekaan sebagai penuntun pengobatan

Uji kepekaan jangan pernah dilakukan pada kuman pencemar atau kuman komensal yang termasuk flora normal, atau organisme lain yang tidak memiliki hubungan sebab-akibat dengan proses infeksi. Sebagai contoh, adanya *Eschericia coli* dalam urin dalam jumlah yang kurang dari jumlah bermakna jangan dianggap sebagai penyebab infeksi, dan akan tidak berguna, bahkan menyesatkan, untuk melakukan antibiogram.

Uji kepekaan dilakukan hanya pada biakan organisme murni yang dianggap menyebabkan proses infeksi. Organisme tersebut juga harus diidentifikasi karena tidak semua mikroorganisme yang diisolasi dari seorang pasien dengan infeksi memerlukan antibiogram.

Uji kepekaan rutin tidak diindikasikan dalam keadaan-keadaan berikut:

- Jika organisme penyebab termasuk spesies yang kepekaannya terhadap obat tertentu dapat diramalkan. Inilah yang berlaku untuk *Streptococcus pyogenes* dan *Neisseria meningitidis*, yang umumnya masih peka terhadap bensilpenisilin. (Walaupun demikian, akhir-akhir ini telah ada beberapa laporan sporadik mengenai meningokokus yang resisten terhadap bensilpenisilin.) Ini juga berlaku untuk streptokokus dalam tinja (enterokokus), yang dengan sedikit pengecualian, sensitif terhadap ampicilin. Jika resistensi mikroorganisme ini diduga berdasarkan penilaian klinis, galur yang mewakili harus diserahkan ke laboratorium rujukan yang kompeten.
- Jika organisme penyebab membutuhkan media yang diperkaya, misalnya *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*. Uji kepekaan difusi cakram mungkin memberi hasil yang tidak tepat jika tidak mengikuti teknik yang sesuai secara ketat. Munculnya varian spesies-spesies yang menghasilkan β -laktamase tersebut telah menyebabkan diperkenalkannya uji-uji khusus, seperti uji produksi β -laktamase *in vitro*, yang dibahas pada halaman 74. Laboratorium pusat dan regional bertanggung jawab untuk memantau kepekaan pneumokokus, gonokokus dan *Haemophilus*. Jika timbul masalah dengan galur yang resisten, laboratorium perifer harus diberitahu dan diberikan instruksi mengenai metode pengujian yang sesuai dan skema pengobatan alternatif.
- Pada infeksi usus tanpa penyulit yang disebabkan oleh salmonella (selain *S. typhi* atau *S. paratyphi*). Pengobatan dengan antimikroba untuk infeksi yang demikian tidak dibenarkan, bahkan dengan obat yang menunjukkan aktivitas *in vitro*. Saat ini terdapat cukup bukti bahwa pengobatan antimikroba pada gastroenteritis salmonella yang umum (dan juga untuk sebagian besar penyakit diare yang tidak diketahui penyebabnya) tidak mempunyai manfaat klinis untuk pasien. Sebaliknya, antimikroba dapat memperpanjang ekskresi dan penyebaran salmonella serta dapat menyebabkan seleksi varian yang resisten.

Uji kepekaan sebagai alat bantu epidemiologis

Uji kepekaan rutin terhadap patogen-patogen utama (*S. typhi*, shigella) berguna sebagai salah satu bagian program pemantauan infeksi usus yang menyeluruh. Uji tersebut esensial untuk menginformasikan dokter mengenai munculnya galur-galur resisten (*S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol, shigella yang resisten terhadap kotrimoksazol dan yang resisten terhadap ampicilin) dan perlunya memodifikasi skema pengobatan baku. Walaupun uji kepekaan untuk serotipe salmonella non-tifoid yang menyebabkan infeksi usus tidak relevan untuk mengobati pasien, munculnya galur yang multiresisten merupakan peringatan mengenai penggunaan obat antimikroba yang berlebihan dan salah.

Pemantauan hasil uji kepekaan rutin yang berkesinambungan merupakan sumber informasi yang sangat baik mengenai prevalensi stafilokokus dan batang Gram-negatif resisten yang mungkin bertanggung jawab untuk terjadinya infeksi silang di rumah sakit. Pelaporan pola kepekaan galur yang sering ditemukan secara periodik merupakan alat bantu yang sangat berharga untuk membentuk kebijakan yang baik mengenai penggunaan antimikroba di rumah sakit dengan membatasi dan/ atau rotasi obat-obat penyelamat jiwa, seperti aminoglikosida dan sefalosporin.

Tabel 23. Set dasar antimikroba untuk uji kepekaan rutin^a

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Usus	Urin	Darah & jaringan	
Set 1	bensilpenisilin	ampisilin	sulfonamid	ampisilin	piperacilin
Pilihan pertama	oksasilin	kloramfenikol	trimetoprim	kloramfenikol	gentamisin
	eritromisin	kotrimoksazol	kotrimoksazol	kotrimoksazol	tobramisin
	tetrasiklin	asam nalidiksate	ampisilin	tetrasiklin	
	kloramfenikol	tetrasiklin	nitrofurantoin	sefalotin	
			asam nalidiksate	gentamisin	
			tetrasiklin	amoksi-klav ^b	
Set 2	gentamisin	norfloksasin	norfloksasin	sefuroksim	amikasin
Obat tambahan	amikasin		kloramfenikol	seftriakson	siprofloksasin
	kotrimoksazol		gentamisin	siprofloksasin	seftazidin
	klindamisin		amoksi-klav ^b	piperasilin	
	nitrofurantoin			amikasin	

^a Catatan tentang agen antimikroba dijabarkan secara tersendiri dalam teks.

^b Amoksisilin dan asam klavulanat (penghambat β -laktamase).

tetrasiklin normalnya tetap sensitif terhadap minosiklin. Dengan demikian, cakram minosiklin mungkin berguna untuk menguji galur stafilocokus yang multiresisten.

- Hasil untuk cakram *kloramfenikol* dapat diterapkan untuk tiamfenikol, obat terkait dengan spektrum antimikroba yang sebanding tetapi tanpa risiko anemia aplastik yang sudah diketahui.
- Hanya satu wakil *sulfonamid* (sulfafurazol) yang diperlukan dalam pengujian.
- Cakram *kotrimoksazol* mengandung kombinasi trimetoprim dan suatu sulfonamid (sulfametoksazol). Kedua komponen kombinasi yang sinergis ini mempunyai sifat farmakokinetik yang sebanding dan umumnya bekerja sebagai obat tunggal.
- Ampisilin* adalah prototipe kelompok penisilin spektrum luas dengan aktivitas melawan banyak bakteri Gram-negatif. Karena sensitif terhadap β -laktamase, ampisilin sebaiknya tidak digunakan untuk menguji stafilocokus. Umumnya, kepekaan terhadap ampisilin juga berlaku untuk anggota lain golongan ini: amoksisilin, pivampisilin, talampisilin, dll. (walaupun amoksisilin dua kali lebih aktif terhadap salmonella dan hanya separuh keaktifan ampisilin terhadap shigella dan *H. influenzae*).
- Hanya *sefalotin* yang perlu diuji secara rutin karena spektrumnya mewakili semua sefalosporin generasi pertama yang lain (sefalekssin, sefradin, sefaloridin, sefazolin, sefapirin). Jika tersedia sefalosporin generasi kedua dan ketiga serta senyawa terkait (sefamisin) dengan spektrum yang diperluas, cakram tersendiri untuk beberapa obat yang baru tersebut mungkin dibenarkan pada kasus-kasus tertentu (sefoksitin, sefamandol, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson). Walaupun beberapa sefalosporin dapat digunakan untuk mengobati infeksi stafilocokus yang berat, kepekaan galur yang menginfeksi dapat diperoleh dari hasil dengan oksasilin seperti yang telah disebutkan pada nomor 2 di atas.
- Eritromisin* digunakan untuk menguji kepekaan terhadap beberapa anggota golongan makrolida yang lain (oleandomisin, spiramisin).
- Aminoglikosida* membentuk sekelompok obat yang terkait secara kimiawi, yang mencakup streptomisin, gentamisin, kanamisin, netilmisin, dan tobramisin. Spektrum antimikroba obat-obat tersebut tidak selalu terkait cukup erat untuk menduga adanya resistensi silang, tetapi obat-obat ini terbukti memiliki efektivitas yang sama terhadap patogen-patogen yang sensitif. Banyak penelitian yang membandingkan nefrotoksisitas dan ototoksisitas gentamisin, netilmisin, dan tobramisin, tetapi tidak ada bukti konklusif yang menyatakan bahwa salah satu obat tersebut kurang toksik dibandingkan yang lainnya. Setiap laboratorium sangat dianjurkan untuk memilih

Pemilihan obat untuk uji kepekaan rutin di laboratorium klinis

Pemilihan obat-obat yang digunakan dalam antibiogram rutin ditentukan berdasarkan pertimbangan spektrum antibakteri obat tersebut, sifat farmakokinetik, toksisitas, efektivitas, dan ketersediaannya, serta biayanya bagi pasien dan komunitas. Di antara begitu banyak obat antimikroba yang dapat digunakan untuk mengobati pasien yang terinfeksi oleh suatu organisme tertentu, hanya sejumlah kecil obat yang dipilih secara cermat yang perlu diikutsertakan dalam uji kepekaan.

Tabel 23 menunjukkan obat-obat antimikroba yang diuji pada berbagai keadaan. Obat-obat dalam tabel tersebut dibagi menjadi dua set. Set 1 mencakup obat-obat yang tersedia di sebagian besar rumah sakit dan yang untuknya harus dikerjakan pengujian rutin bagi tiap galur. Uji untuk obat-obat pada set 2 dikerjakan hanya atas permintaan khusus dari dokter, atau jika organisme penyebab resisten terhadap obat-obat pilihan pertama, atau jika ada alasan lain (alergi terhadap obat, atau tidak tersedianya obat) yang membenarkan pengujian lebih lanjut. Banyak antimikroba dengan aktivitas klinis yang baik telah dikeluarkan dari tabel tersebut, tetapi harus ditekankan bahwa obat-obat tersebut jarang diperlukan dalam penatalaksanaan pasien yang terinfeksi. Dalam kasus-kasus yang sangat jarang, satu atau lebih obat tambahan harus disertakan jika ada alasan khusus yang diketahui dokter, atau jika tersedia obat-obat baru dan lebih baik. Oleh karena itu, diharapkan untuk revisi tabel ini secara periodik dan ini harus dilakukan setelah diskusi yang layak dengan staf klinis. Banyak masalah yang timbul dalam praktek karena klinisi tidak selalu menyadari bahwa hanya satu perwakilan dari tiap golongan obat antimikroba yang dimasukkan dalam uji rutin. Hasil yang didapat untuk obat tersebut kemudian dapat diterapkan pada semua atau sebagian besar anggota golongan tersebut. Timbul kesulitan di beberapa negara jika dokter hanya mengenal nama dagang komersial obat dan bukan nama generiknya. Usaha serius harus dilakukan untuk menginformasikan nama internasional non-paten zat-zat farmakologis tersebut kepada para personel medis dan mendorong penggunaannya.¹

1. Cakram *bensilpenisilin* digunakan untuk menguji kepekaan terhadap semua penisilin yang sensitif terhadap β -laktamase (seperti fenoksimetilpenisilin oral dan fenetisilin). Isolat stafilokokus yang masuk dalam kategori resisten menghasilkan β -laktamase dan harus diobati dengan penisilin G yang resisten terhadap β -laktamase atau dengan antimikroba lain, seperti eritromisin.
2. Cakram *oksasilin* mewakili seluruh golongan penisilin yang resisten terhadap β -laktamase (termasuk metisilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin, dan flukloksasilin). Bukti klinis yang kuat menunjukkan bahwa terdapat resistensi silang antara golongan metisilin dan sefalosporin. Jadi, tidaklah berguna dan menyesatkan untuk memasukkan sefalotin dalam antibiogram untuk stafilokokus.

Resistensi terhadap metisilin dan obat-obat terkait seringnya merupakan jenis yang heterogen, yaitu sebagian besar sel mungkin sensitif penuh dan menghasilkan zona inhibisi yang lebar, sedangkan bagian yang resisten muncup dalam bentuk koloni-koloni kecil terpisah yang tumbuh dalam zona inhibisi tersebut. Jenis resistensi ini lebih jelas jika suhu inkubasi diatur pada 35° C² atau jika waktu inkubasi diperpanjang.

Kelemahan metisilin yang serius, sebagai cakram yang mewakili penisilin yang resisten terhadap β -laktamase, adalah sifatnya yang sangat labil bahkan pada keadaan penyimpanan konvensional. Cakram oksasilin jauh lebih resisten terhadap kerusakan dan karenanya lebih disukai untuk uji difusi baku. Cakram kloksasilin dan dikloksasilin tidak digunakan karena keduanya tidak dapat menunjukkan adanya galur yang heteroresisten.

3. Hasil untuk cakram *tetrasiklin* dapat diterapkan untuk klortetrasiklin, oksitetrasiklin, dan anggota lain dari golongan ini. Walaupun demikian, sebagian besar stafilokokus yang resisten terhadap

¹ International Nonproprietary Names (INN) for Pharmaceutical Substances. Cumulative list No. 9. Geneva, World Health Organization, 1996.

² Sahm DF et al. Current concepts and approaches to antimicrobial agent susceptibility testing. In: Cumitech 25, Washington, DC, American Society for Microbiology, 1988.

satu obat tunggal untuk uji kepekaan primer. Obat-obat lain harus disimpan untuk pengobatan pasien pengidap infeksi yang disebabkan oleh organisme yang resisten.

11. *Nitrofurantoin* penggunaannya terbatas hanya untuk pengobatan infeksi saluran kemih, dan sebaiknya jangan diuji terhadap mikroorganisme yang didapatkan dari bahan lain selain urin.

Tabel 24 memberikan informasi mengenai batas-batas diameter zona untuk galur kontrol.

Metode modifikasi Kirby-Bauer

Metode difusi cakram, yang mulanya dijabarkan pada tahun 1966,¹ dibakukan dengan baik dan telah dievaluasi secara luas. Agensi-agensi resmi telah merekomendasikannya, dengan sedikit modifikasi, sebagai metode rujukan yang dapat digunakan sebagai teknik rutin dalam laboratorium klinis.

Reagen

Agar Mueller-Hinton

1. Agar Mueller-Hinton harus dibuat dari dasar agar yang dikeringkan menurut instruksi pabrik pembuat. Media haruslah sedemikian rupa sehingga didapatkan ukuran zona kontrol dalam batas-batas yang dipublikasikan (lihat Tabel 24). Media tidak boleh dipanaskan secara berlebihan.
2. Dinginkan media sampai suhu 45–50° C dan tuangkan ke dalam cawan petri. Biarkan mengeras pada permukaan yang datar, dengan kedalaman kira-kira 4 mm. Cawan petri berdiameter 9 mm memerlukan sekitar 25 ml media.
3. Pada saat agar telah memadat, keringkan lempeng untuk segera dipakai selama 10–30 menit pada suhu 35° C dengan meletakkan cawan petri pada posisi tegak dalam inkubator, dengan tutup yang dimiringkan.
4. Lempeng yang tidak terpakai dapat disimpan dalam kantung plastik; harus ditutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin. Lempeng yang disimpan dengan cara ini akan bertahan selama 2 minggu.

Untuk memastikan bahwa diameter zona cukup tepat untuk uji kepekaan terhadap sulfonamida dan kotrimoksazol, agar Mueller-Hinton harus mempunyai kadar inhibitor, timidin dan timin, yang rendah. Oleh karena itu, tiap lot agar Mueller-Hinton harus diuji dengan galur kontrol *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 atau 33186) dan satu cakram kotrimoksazol. Suatu lot media yang memuaskan akan menghasilkan zona inhibisi yang jelas dengan diameter 20 mm atau lebih yang harus bebas dari pertumbuhan berkabut atau koloni-koloni tipis.

Cakram antimikroba

Semua cakram antimikroba dengan diameter dan potensi sesuai yang tersedia di pasaran dapat digunakan. Persediaan cakram antimikroba sebaiknya disimpan dalam suhu –20° C; ruang pembeku pada lemari pendingin rumah cukup baik untuk menyimpan. Persediaan sedikit cakram untuk kerja dapat disimpan dalam lemari pendingin sampai 1 bulan. Pada saat dikeluarkan dari lemari pendingin, wadahnya harus dibiarkan pada suhu ruang selama sekitar 1 jam untuk membiarkan suhunya mencapai suhu ruang. Prosedur ini mengurangi jumlah pengembunan yang terjadi jika udara hangat mencapai wadah yang dingin. Jika menggunakan alat khusus untuk mengeluarkan cakram, alat ini harus mempunyai selubung yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin. Alat ini juga harus dibiarkan mencapai suhu ruang sebelum dibuka.

¹ Bauer AW dkk. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *American journal of clinical pathology*, 1996; 45: 493-196.

Tabel 24. Batas-batas diameter zona untuk galur kontrol^a

Antimikroba	Potensi cakram	Diameter zona inhibisi (mm)		
		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
amikasin	30 µg	20-26	19-26	18-26
amoksi-klav ^b	20/10 µg	28-36	19-25	–
ampisilin	10 µg	27-35	16-22	–
bensilpenisilin	10 IU	26-37	–	–
sefalotin	30 µg	29-37	15-21	–
sefazolin	30 µg	29-35	23-29	–
seftazidim	30 µg	16-20	25-32	22-29
sefotaksim	30 µg	25-31	29-35	18-22
seftriakson	30 µg	22-28	29-35	17-23
sefuroksim	30 µg	27-35	20-26	–
kloramfenikol	30 µg	19-26	21-27	–
siprofloksasin	5 µg	22-30	30-40	25-33
klindamisin	2 µg	24-30	–	–
kotrimoksazol	25 µg	24-32	24-32	–
eritromisin	15 µg	22-30	–	–
gentamisin	10 µg	19-27	19-26	16-21
asam nalidiksarat	30 µg	–	22-28	–
nitrofurantoin	300 µg	18-22	20-25	–
norfloksasin	10 µg	17-28	28-35	22-29
oksasilin	1 µg	18-24	–	–
piperasilin	100 µg	–	24-30	25-33
sulfonamida ^c	300 µg	24-34	15-23	–
tetrasiklin	30 µg	24-30	18-25	–
tobramisin	10 µg	19-29	18-26	19-25
trimetoprim	5 µg	19-26	21-28	–
vankomisin	30 µg	17-21	–	–

^a National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. 6th ed. Vol. 21 No 1 (M2-A7 dan M7-A5) dan 11th informational supplement 2001 (M100-S11).

^b Amoksisilin dan asam klavulanat (inhibitor β -laktamase).

^c Sulfisoksazol.

Baku kekeruhan

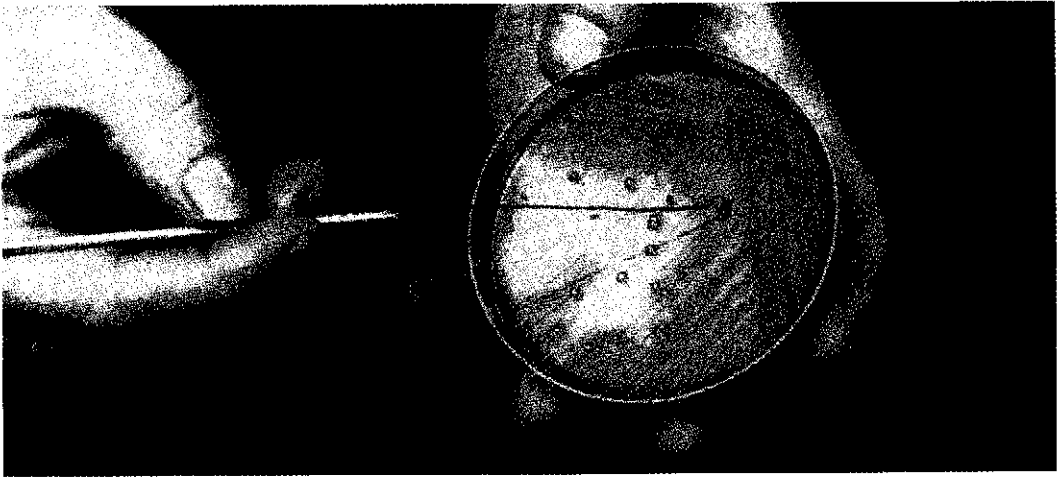
Buatlah baku kekeruhan dengan menuang 0,6 ml larutan barium klorida dihidrat 1% (10 g/l) ke dalam gelas ukur 100 ml, dan penuhi dengan asam sulfat 1% (10 ml/l) sampai mencapai 100 ml. Larutan baku kekeruhan ini harus dimasukkan ke dalam tabung yang identik dengan tabung yang digunakan untuk sampel kaldu. Larutan baku ini dapat disimpan dalam gelap pada suhu ruang selama 6 bulan, asalkan tertutup rapat untuk mencegah penguapan.

Lidi kapas

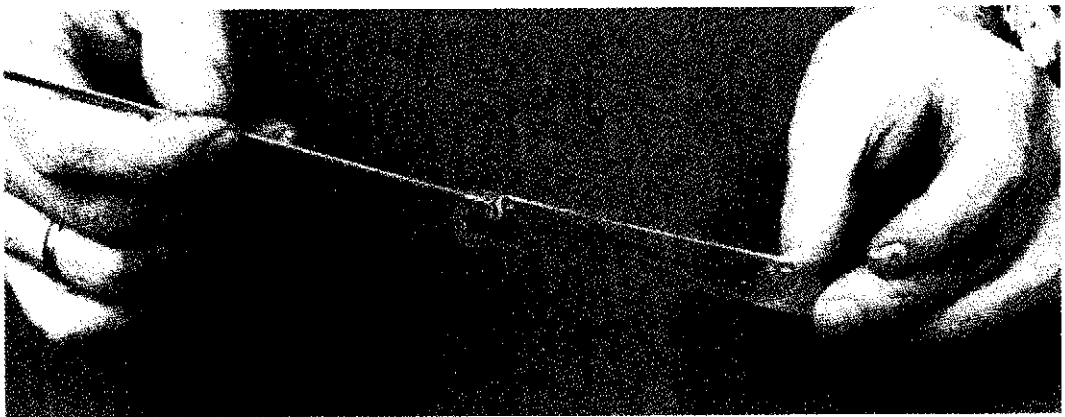
Harus disiapkan sejumlah persediaan pengusap kapas pada batang kayu. Lidi kapas ini dapat disterilkan dalam kaleng, tabung biakan atau kertas, dengan autoklaf atau dengan pemanasan kering.

Cara kerja

Untuk membuat inokulum dari lempeng biakan primer, dengan menggunakan sengkeli, sentuh puncak dari tiap 3–5 koloni organisme berpenampilan sama yang akan diuji.

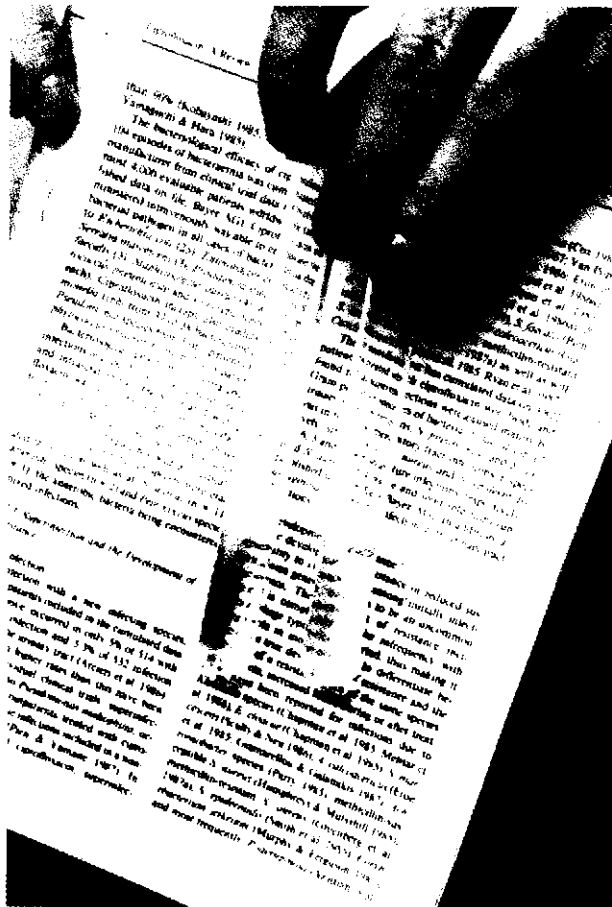


Pindahkan pertumbuhan (koloni) tersebut ke sebuah tabung berisi saline.



Jika inokulum harus dibuat dari biakan murni, satu sengkeli penuh pertumbuhan yang konfluens, disuspensikan kedalam larutan garam fisiologis dengan cara yang sama.

Bandingkan tabung tersebut dengan baku kekeruhan dan atur kepekatan suspensi uji sampai sama dengan larutan baku dengan menambahkan bakteri atau larutan garam fisiologis.



Pengaturan kekeruhan inokulum yang tepat penting untuk memastikan hasil pertumbuhan yang merata atau hampir merata.

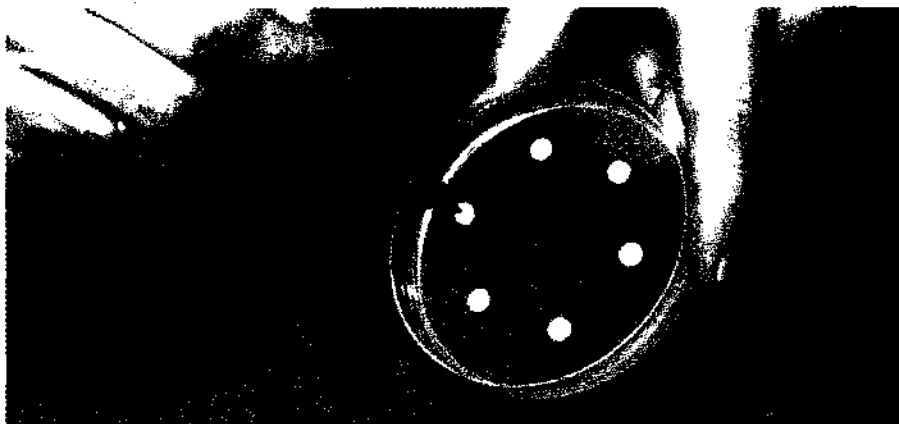
Inokulasikan lempeng dengan cara mencelupkan lidi kapas steril ke dalam inokulum. Singkirkan inokulum berlebih dengan menekan dan memutar lidi kapas kuat-kuat pada sisi tabung di atas batas cairan.



Guratkan lidi kapas ke seluruh permukaan media tiga kali, dengan memutar lempeng dengan sudut 60° setelah setiap pengolesan. Akhirnya, lewatkan lidi kapas ke sekeliling pingiran permukaan agar. Biarkan inokulum mengering selama beberapa menit pada suhu ruang dengan cawan tertutup.



Cakram antimikroba dapat diletakkan pada lempeng yang telah diinokulasi dengan menggunakan sepasang penjepit steril. Lebih mudah menggunakan suatu cetakan (Gbr. 15) untuk meletakkan cakram secara merata.



Ujung jarum yang steril dapat juga digunakan untuk meletakkan cakram antimikroba pada agar yang telah diinokulasi.



Sebagai alternatif, dapat digunakan alat pembagi cakram antimikroba untuk memasang cakram pada agar yang telah diinokulasi.



Pada agar yang berdiameter 9–10 cm maksimal dapat diletakkan tujuh cakram. Enam cakram dapat diberi jarak yang sama, kira-kira 15 mm dari tepi lempeng, dan 1 cakram diletakkan pada bagian tengah lempeng. Tiap cakram harus ditekan perlahan untuk memastikan kontak yang merata dengan media.

Agar harus diletakkan dalam inkubator pada suhu 35° C dalam waktu 30 menit setelah disiapkan. Suhu di atas 35° C membuat hasil untuk oksasilin/ metisilin tidak sah.

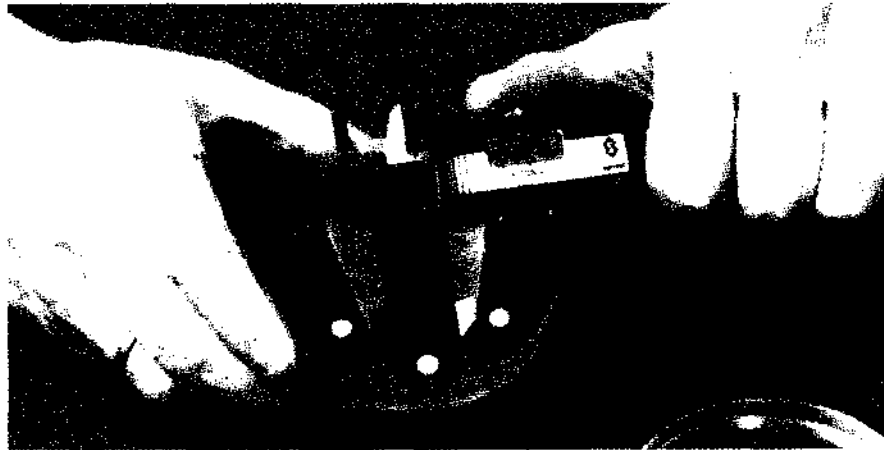
Jangan diinkubasi dalam atmosfer karbon dioksida.

Setelah inkubasi semalaman, diameter tiap zona (termasuk diameter cakram) harus diukur dan dicatat dalam mm. Hasilnya kemudian diinterpretasikan menurut diameter kritis yang ditunjukkan pada Tabel 25.

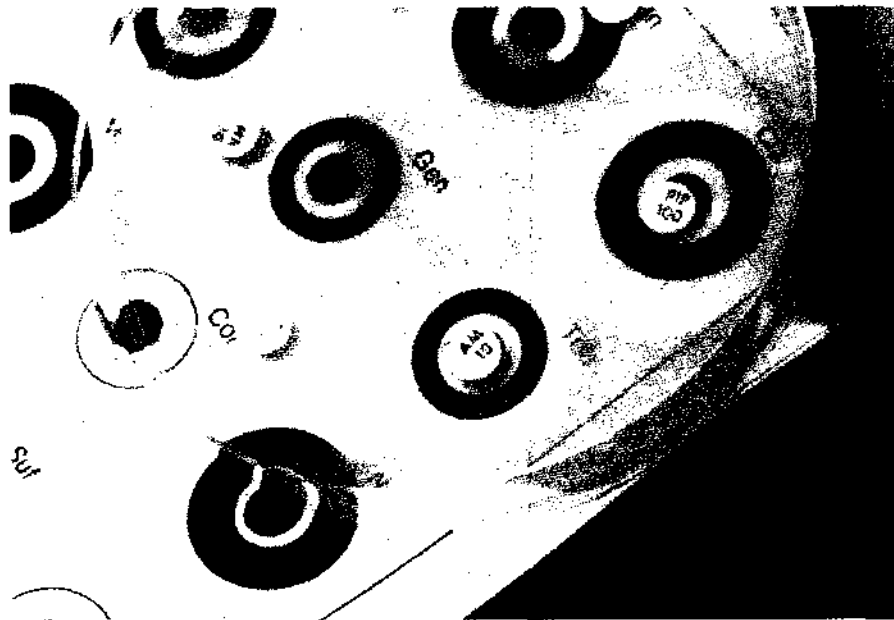
Pengukuran dapat dilakukan dengan penggaris pada permukaan bawah lempeng supaya tidak perlu membuka tutupnya.



Jika medianya tidak tembus cahaya, zona dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.



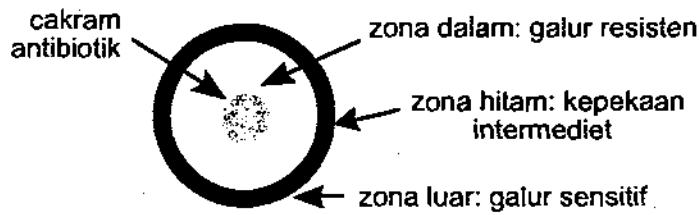
Suatu cetakan (Gbr. 14) dapat digunakan untuk menilai hasil akhir uji kepekaan.



Titik akhir hambatan dinilai dengan mata telanjang pada tepi tempat pertumbuhan dimulai, tetapi terdapat tiga pengecualian:

- Dengan sulfonamida dan kotrimkosazol, terdapat sedikit pertumbuhan dalam zona hambatan; pertumbuhan semacam itu harus diabaikan.
- Jika stafilokokus yang menghasilkan β -laktamase diuji dengan bensilpenisilin, dihasilkan zona hambatan dengan tepi yang menonjol dan berbatas tegas; ini mudah dilihat jika dibandingkan dengan kontrol sensitif, dan tanpa memandang zona hambatan, kuman harus dilaporkan sebagai resisten.
- Spesies *Proteus* tertentu dapat menyebar ke dalam daerah hambatan di sekeliling beberapa antimikroba, tetapi zona hambatan biasanya berbatas jelas dan lapisan tipis pertumbuhan yang menyebar harus diabaikan.

Gambar 14. Cetakan untuk menentukan kepekaan



WHO 91127

Penafsiran ukuran zona

Menggunakan cetakan. Jika ukuran zona dibandingkan dengan cetakan, satu cetakan harus dipersiapkan untuk tiap-tiap agen antimikroba (lihat Gbr. 14). Hasilnya—sensitif, resisten, atau intermediet—dapat dibaca segera: “sensitif” jika tepi zona terletak di luar lingkaran hitam; “resisten” jika tidak ada zona atau jika terletak di dalam lingkaran putih; dan “intermediet” jika tepi zona hambatan terletak pada lingkaran hitam.

Menggunakan penggaris. Jika ukuran zona diukur dalam mm, hasil harus tafsirkan menurut diameter kritis yang diberikan pada Tabel 25.

Uji kepekaan langsung versus tidak langsung

Dalam metode baku yang dijelaskan di atas, inokulum dibuat dari koloni-koloni di lempeng agar biakan primer atau dari biakan murni. Ini disebut “uji kepekaan tidak langsung”. Pada kasus-kasus tertentu, jika harus mendapatkan hasil yang cepat, inokulum baku dapat digantikan oleh spesimen patologis itu sendiri, misalnya urin, biakan darah yang positif, atau apusan pus. Pada spesimen urin, pemeriksaan mikroskopik sedimen harus dilakukan dulu untuk melihat bukti adanya infeksi, misalnya adanya sel-sel pus dan/atau organisme. Urin kemudian dapat digunakan sebagai inokulum pada uji baku. Demikian juga, uji kepekaan dapat dilakukan pada biakan darah yang diinkubasi yang menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan bakteri, atau apusan pus dapat digunakan sebagai inokulum langsung jika sediaan apus pulasan Gram menunjukkan adanya sejumlah besar organisme sejenis. Ini disebut “uji kepekaan langsung”; keunggulannya dibandingkan uji tidak langsung, yaitu hasilnya didapat 24 jam lebih cepat. Kelemahan utamanya, yaitu inokulum tidak dapat dikendalikan dengan baik. Jika pada lempeng agar uji kepekaan pertumbuhannya terlalu tipis atau terlalu tebal, atau biakannya berupa campuran, hasil harus ditafsirkan dengan hati-hati, dan uji diulang pada biakan murni.

Faktor-faktor teknis yang mempengaruhi ukuran zona pada metode difusi-cakram

Kepekatan inokulum

Jika inokulum terlalu encer, zona hambatan akan menjadi lebih lebar walaupun kepekaan organismenya tidak berubah. Galur yang relatif resisten mungkin dilaporkan sebagai sensitif. Sebaliknya, jika inokulum terlalu pekat, ukuran zona akan menyempit dan galur yang sensitif dapat dilaporkan sebagai resisten. Biasanya hasil optimal didapat dengan ukuran inokulum yang menghasilkan pertumbuhan yang hampir menyatu (konfluen).

Tabel 25. Grafik interpretasi ukuran zona untuk bakteri yang cepat tumbuh menggunakan teknik Kirby-Bauer yang dimodifikasi^a

Agen antimikroba	Diameter zona inhibisi (mm)			
	Potensi cakram	Resisten	Intermediet	Sensitif
amikasin	30 µg	<14	15-16	>17
amoksisiklav ^b	20/10µg	<13	14-17	>18
ampisilin, jika menguji				
– Enterobacteriaceae	10 µg	<13	14-16	>17
– enterococcus	10 µg	<16	–	>17
bensilpenisilin, jika menguji				
– stafilococcus	10 IU	<28	–	>29
– enterococcus	10 IU	<14	–	>15
sefalotin	30 µg	<14	15-17	>18
sefazolin	30 µg	<14	15-17	>18
sefotaksim	30 µg	<14	15-22	>23
seftazidim	30 µg	<14	15-17	>18
seftriakson	30 µg	<13	14-20	>21
sefuroksim sodium, sefamandol	30 µg	<14	15-17	>18
kloramfenikol	30 µg	<12	13-17	>18
siprofloksasin	5 µg	<15	16-20	>21
klindamisin	2 µg	<14	15-20	≥21
kotrimoksazol	25 µg	<10	11-15	≥16
eritromisin	15 µg	<13	14-22	>23
gentamisin	10 µg	<12	13-14	>15
asam nalidiksik ^c	30 µg	<13	14-18	≥19
nitrofurantoin ^c	300 µg	<14	15-16	>17
norfloksasin ^c	10 µg	<12	13-16	>17
oksasilin	1 µg	<10	10-12	>13
piperasilin, jika menguji				
– <i>P. aeruginosa</i>	100 µg	<17	–	>18
– batang Gram-negatif lain	100 µg	<17	18-20	>21
sulfonamida ^{c,d}	300 µg	<12	13-16	>17
tetrasiklin	30 µg	<14	15-18	>19
tobramisin	10 µg	<12	13-14	>15
trimetoprim ^c	5 µg	<10	11-15	≥16
vankomisin, jika menguji				
– stafilococcus	30 µg	–	–	>15
– enterococcus	30 µg	<14	15-16	>17

^a National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests*. 6th ed. Vol. 21 No 1 (M2-A7 dan M7-A5) dan 11th informational supplement 2001 (M100-S11).

^b Amoksisilin dan asam klavulanat (inhibitor β-laktamase).

^c Hanya berlaku untuk menguji isolat dari infeksi saluran kemih dan beberapa patogen enterik.

^d Sulfisoksazol.

Waktu pemasangan cakram

Jika setelah ditanami dengan galur uji lempeng agar, dibiarkan pada suhu ruang lebih lama dari waktu baku, perkembangbiakan inokulum dapat terjadi sebelum cakram dipasang. Ini menyebabkan zona diameter mengecil dan dapat menyebabkan suatu galur sensitif dilaporkan sebagai resisten.

Suhu inkubasi

Uji kepekaan biasanya diinkubasi pada suhu 35° C untuk pertumbuhan yang optimal. Jika suhu diturunkan, waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan efektif akan memanjang dan dihasilkan zona yang lebih lebar. Jika galur *Staphylococcus aureus* yang heteroresisten diuji dengan metisilin (oksa-silin), bagian yang resisten dapat dideteksi pada suhu 35° C. Pada suhu yang lebih tinggi, seluruh biakan tampak sensitif. Pada suhu 35° C atau lebih rendah, koloni yang resisten tumbuh di dalam zona hambatan. Koloni-koloni yang resisten dapat dilihat lebih mudah bila agar dibiarkan selama beberapa jam pada suhu ruang sebelum pembacaan hasil. Koloni-koloni tersebut harus selalu diidentifikasi untuk memeriksa apakah merupakan pencemar.

Waktu inkubasi

Kebanyakan teknik menerapkan masa inkubasi antara 16–18 jam. Walaupun demikian, pada keadaan darurat, laporan pendahuluan dapat dibuat setelah 6 jam. Ini tidak dianjurkan secara rutin dan hasilnya harus selalu dipastikan setelah masa inkubasi konvensional.

Ukuran lempeng, ketebalan media agar, dan pengaturan jarak cakram antimikroba

Uji kepekaan biasanya dikerjakan menggunakan cawan petri ukuran 9–10 cm dan tidak lebih dari 6 atau 7 cakram antimikroba pada tiap lempeng agar. Jika jumlah antimikroba yang harus diuji lebih banyak, lebih disukai menggunakan dua lempeng atau satu lempeng agar berdiameter 14 cm. Zona hambatan yang sangat besar mungkin terbentuk pada media yang sangat tipis; dan sebaliknya berlaku untuk media yang tebal. Perubahan kecil dalam ketebalan lapisan agar efeknya dapat diabaikan. Pengaturan jarak cakram yang tepat sangat penting untuk mencegah tumpang tindihnya zona hambatan atau deformasi didekat tepi-tepi lempeng (lihat Gbr. 15).

Potensi cakram antimikroba

Diameter zona hambatan terkait dengan jumlah obat dalam cakram. Jika potensi obat berkurang akibat rusak selama penyimpanan, zona hambatan akan menunjukkan pengurangan ukuran yang sesuai.

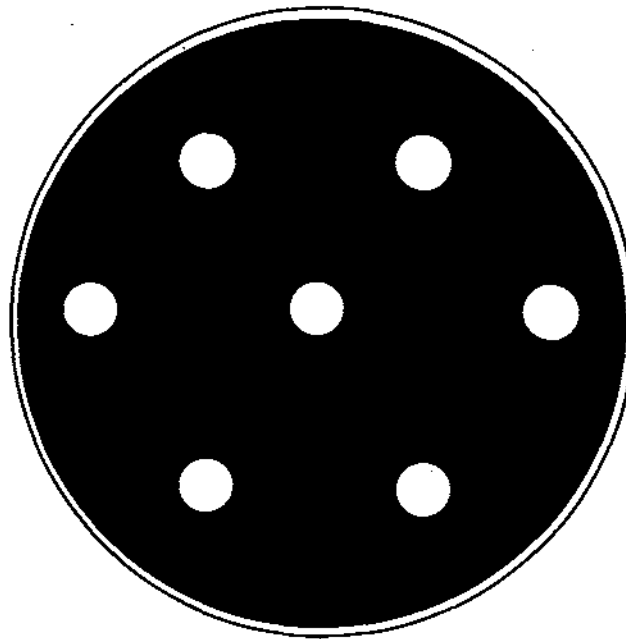
Komposisi media

Media mempengaruhi ukuran zona melalui efeknya terhadap kecepatan pertumbuhan organisme, kecepatan difusi obat antimikroba, dan aktivitas obat. Penggunaan media harus sesuai dengan metode tersebut.

Banyak faktor yang mempengaruhi diameter zona yang mungkin diperoleh pada uji organisme yang sama nyata-nyata menunjukkan perlunya standardisasi pada metode difusi-cakram. Hasil yang sah hanya bisa didapatkan bila kondisi yang ditetapkan untuk metode tertentu diikuti secara ketat. Perubahan pada salah satu faktor yang mempengaruhi pemeriksaan dapat menghasilkan laporan-laporan yang sangat menyesatkan klinisi.

Ketelitian dan ketepatan metode harus dipantau dengan menetapkan program pengendalian mutu yang dijabarkan berikut ini. Dengan demikian, penyimpangan dapat segera diusut dan diambil tindakan untuk mengatasinya.

Gambar 15. Cetakan untuk penempatan cakram kepekaan secara merata pada lempeng berdiameter 90 mm



WHO 86051

Kendali mutu

Perlunya pengendalian mutu dalam uji kepekaan

Hasil akhir suatu uji difusi cakram dipengaruhi oleh sejumlah besar variabel. Beberapa faktor mudah dikendalikan—misalnya, kepekatan inokulum dan suhu inkubasi, tetapi laboratorium jarang mengetahui komposisi tepat suatu media komersial atau variasi mutu antar-*batch*, dan laboratorium tidak dapat mengabaikan kandungan antimikroba dalam cakram. Oleh karena itu, hasil pengujian harus dipantau secara terus-menerus dengan program kendali mutu, yang harus dianggap sebagai bagian dari prosedur itu sendiri.

Ketelitian dan ketepatan uji dikontrol dengan menggunakan serangkaian galur kontrol secara paralel dengan kepekaan terhadap antimikroba yang diketahui. Galur-galur kendali mutu ini diuji dengan menggunakan metode yang sama persis dengan organisme uji. Ukuran zona yang ditunjukkan oleh organisme kontrol harus masuk dalam kisaran diameter yang diberikan dalam Tabel 24. Jika hasilnya terus-menerus keluar dari kisaran tersebut, ini harus dianggap sebagai petunjuk telah terjadinya kesalahan teknis dalam pengujian, atau reagensinya yang salah. Setiap reagen dan setiap langkah uji harus diusut sampai penyebab kesalahan ditemukan dan dihilangkan.

Prosedur baku untuk kendali mutu

Program pengendalian mutu harus menguji galur bakteri rujukan baku secara paralel dengan biakan-biakan klinis. Uji ini sebaiknya dilakukan setiap minggu, atau pada setiap *batch* uji yang ke-5, juga setiap digunakan *batch* agar Mueller-Hinton baru atau *batch* cakram baru.

Galur-galur baku untuk kendali mutu

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Escherichia coli (ATCC 25922)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Biakan-biakan ini dapat diperoleh dari koleksi biakan nasional. Mereka tersedia di pasaran dalam bentuk pellet biakan mumi yang dikeringkan.

Biakan untuk penggunaan sehari-hari harus ditanam pada agar nutrisi miring (boleh juga agar *tryptic soy*) dan disimpan dalam lemari pendingin. Biakan ini harus disubkultur pada agar miring segar setiap 2 minggu.

Menyiapkan inokulum

Biakan dapat diinokulasi pada semua jenis kaldu, dan diinkubasi sampai kaldu menjadi keruh. Setiap kaldu harus diguratkan pada lempeng agar dan diinkubasi semalaman. Kemudian, koloni-koloni tunggal diambil dan dilakukan uji kepekaan seperti dijabarkan pada halaman 103–108.

Penempatan cakram antimikroba

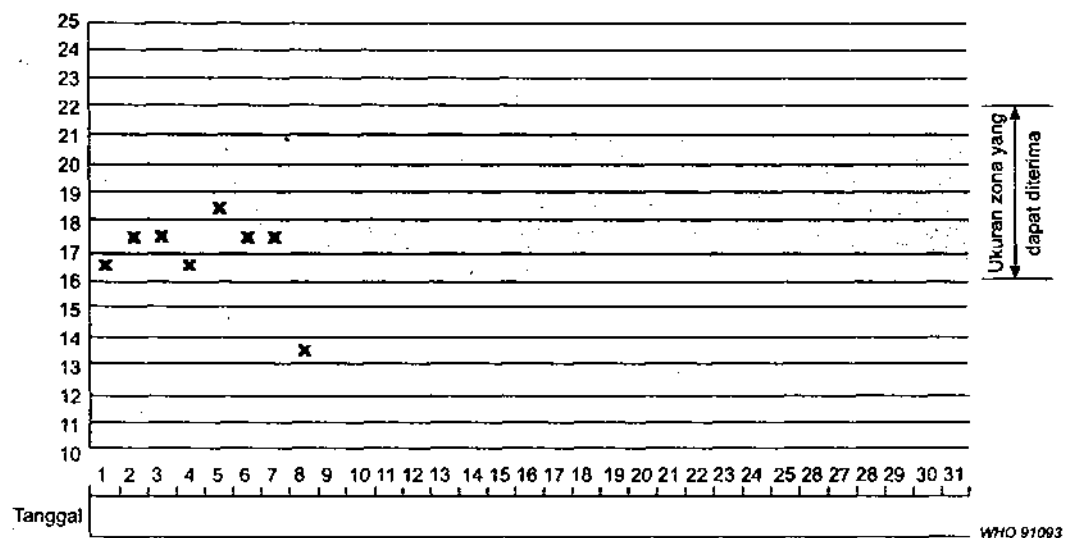
Setelah inokulum diguratkan pada lempeng agar, seperti dijabarkan pada halaman 106, letakkanlah cakram yang sesuai. Cakram yang harus dipilih untuk setiap galur kontrol terdapat pada Tabel 24.

Membaca lempeng

Setelah inkubasi 16–18 jam, diameter zona hambatan harus diukur dengan menggunakan penggaris dan dicatat, bersama dengan tanggal uji, pada suatu grafik kendali mutu khusus. Grafik ini harus menampilkan data untuk tiap kombinasi galur-cakram. Grafik dilabel dalam milimeter dengan petunjuk kisaran zona yang dapat diterima. Contoh grafik semacam itu ditunjukkan pada Gbr. 16. Jika hasilnya terus-menerus keluar dari kisaran yang dapat diterima, perlu diambil tindakan untuk memperbaiki mutu pemeriksaan.

Hasil yang sangat menyimpang, yang tidak dapat dijelaskan oleh adanya kesalahan teknis dalam prosedur, mungkin menunjukkan pencemaran atau perubahan mendadak dalam kepekaan atau ciri pertumbuhan galur kontrol. Jika ini terjadi, galur stok yang baru harus didapatkan dari sumber yang dapat diandalkan.

Gambar 16. Grafik pengendalian mutu untuk uji kepekaan antimikroba



Uji serologis

Pendahuluan

Uji serologis, berbeda dengan biakan dan pemeriksaan mikroskopik, hanya memberikan bukti adanya infeksi secara tidak langsung dengan mendeteksi antigen bakteri atau antibodi yang dihasilkan sebagai respon terhadap bakteri. Uji-uji semacam itu sekarang digunakan secara luas dalam mikrobiologi karena spesifisitas dan sensitivitasnya yang tinggi.

Setelah infeksi awal oleh mikroorganisme patogen, sebagian besar pasien akan menghasilkan antibodi IgM dan IgG. Setelah beberapa minggu, sel-sel yang menghasilkan antibodi IgM akan berubah menghasilkan antibodi IgG, dan selanjutnya hanya antibodi IgG yang ditemukan dalam serum pasien. Infeksi kedua oleh patogen yang sama akan mencetuskan respons IgG saja. Karena sel-sel yang menghasilkan antibodi telah menyimpan memori tentang patogen tersebut, respon akan lebih cepat dan biasanya lebih kuat daripada respon awal; keadaan ini disebut respon anamnestik.

Kadar antibodi biasanya disebut sebagai "titer". Titer diagnostik yang dilaporkan merupakan nilai resiprok pengenceran tertinggi serum pasien dengan antibodi yang masih terdeteksi. Misalnya, jika antibodi terdeteksi dalam serum yang diencerkan 1:1024, tetapi tidak terdeteksi pada pengenceran lebih lanjut, titer serum tersebut adalah 1024. Serum yang diambil pada fase akut infeksi, pada saat infeksi pertama kali dicurigai, disebut serum akut; serum yang diambil selama masa penyembuhan, biasanya 2 minggu setelahnya, disebut serum konvalesen.

Reaksi terhadap antigen terjadi tanpa memandang stadium infeksi walaupun reaksi ini akan bervariasi. Adanya antibodi IgG dalam sampel serum tunggal mungkin menunjukkan paparan lampau terhadap agen tersebut sehingga tidak dapat digunakan untuk mendiagnosis infeksi yang sedang berlangsung. Antigen juga dapat merangsang produksi antibodi yang bereaksi silang dengan antigen lain. Karena antibodi-antibodi ini bersifat non-spesifik, uji yang hanya melibatkan satu sampel serum mungkin menyebabkan kesalahan penafsiran hasil. Untuk sebagian besar uji serologis, serum akut dan serum konvalesen harus diuji keduanya, lebih disukai bila dijalankan bersamaan dalam satu *run*, untuk meniadakan variabel-variabel dalam prosedur uji. Peningkatan titer antibodi sebesar dua kali lipat pengenceran (misalnya, dari pengenceran 1:8 menjadi pengenceran 1:32) biasanya dianggap diagnostik untuk infeksi saat ini. Ini disebut peningkatan titer empat kali lipat. Pengujian sampel serum tunggal mungkin bermanfaat hanya pada kasus-kasus tertentu, misalnya diagnosis infeksi *Mycoplasma pneumoniae*—titer yang tinggi mungkin menunjukkan infeksi baru, atau jika uji tersebut menunjukkan adanya antibodi IgM dan hasilnya dapat dianggap sebagai bukti infeksi saat ini. Jenis reaksi antigen-antibodi tergantung pada keadaan fisik antigen.

Langkah-langkah kendali mutu

Ketepatan dan konsistensi suatu uji serologis sepenuhnya tergantung pada langkah-langkah kendali mutu yang dijalankan sebelum, selama, dan setelah setiap uji. Langkah-langkah kendali mutu ini amat sangat penting karena hasil positif palsu atau negatif palsu mungkin menyebabkan keputusan atau tindakan medis yang dapat mencelakakan pasien. Banyak variabel yang dapat mempengaruhi mutu uji serologis, termasuk pengalaman personel laboratorium, mutu perangkat dan peralatan, keadaan spesimen, bahan kontrol yang digunakan dalam *test-run*, serta interpretasi dan pelaporan hasil. Setelah uji selesai, buanglah bahan-bahan bekas pakai ke dalam wadah yang diisi desinfektan, dan cuci tangan serta permukaan meja kerja dengan desinfektan.

Peralatan

Peralatan dalam suatu laboratorium serologi meliputi penangas air (*water-bath*), inkubator, lemari pendingin, lemari beku, pH meter, neraca, sentrifus, mikroskop, dan pemusing (*rotator*). Pemantauan dan pemeliharaan peralatan secara rutin adalah bagian vital program kendali mutu dalam laboratorium serologi. Servis pemeliharaan rutin harus dilakukan dengan inspeksi berkala seluruh peralatan untuk penyesuaian-penyesuaian kecil. Catatan yang menunjukkan tanggal inspeksi, pemeliharaan dan perbaikan harus dibuat untuk setiap alat.

Penangas air harus dijaga agar bebas dari materi asing dan dikeringkan serta dibersihkan tiap bulan. Suhu penangas air harus dikendalikan secara ketat dan jangan berselisih lebih dari $\pm 1^{\circ}\text{C}$; suhu alat harus diperiksa dan dicatat setiap hari dan selama pemakaian. Sediakan tutup untuk mencegah pendinginan pada permukaan air. Campuran antigen dan antibodi tidak boleh diinkubasi sampai suhu yang diinginkan sudah tercapai selama sedikitnya satu jam. Tinggi air harus sama dengan tinggi cairan dalam tabung atau botol yang ditempatkan dalam penangas air.

Mikroskop sangat penting dalam uji *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) dan uji absorpsi antigen treponema fluoresen (FTA-Abs), serta harus dijaga dengan langkah pemeliharaan yang sebaik-baiknya. Setelah pemakaian, okular, objektif, dan kondensor mikroskop harus dilap bersih dari minyak dan kotoran dengan tisu yang tidak kasar. Pada saat tidak digunakan, mikroskop harus ditutupi dan dilindungi terhadap kelembaban. Intensitas lampu merkuri pada mikroskop fluoresen harus diperiksa berulang-ulang dengan pengukur cahaya (*light meter*).

Pemusing mekanik untuk uji VDRL dan uji *rapid plasma reagin* (RPR) harus diperiksa kecepatannya selama pemakaian; adanya perubahan kecepatan yang dapat berpengaruh buruk terhadap reaksi aglutinasi harus dikoreksi. Pemusing mekanik harus dilumasi secara teratur.

Bahan

Alat yang terbuat dari kaca dan jarum yang digunakan dalam uji serologis harus memenuhi spesifikasi yang dianjurkan pada uji-uji tersebut.

Semua barang pecah-belah, piringan, atau kaca objek yang gompal atau tergores harus dibuang. Penggunaan barang pecah-belah yang kotor atau tidak dibersihkan dengan benar, yang mungkin mempunyai residu bahan organik, merupakan salah satu penyebab utama hasil yang menyesatkan. Petunjuk untuk membersihkan peralatan kaca harus ditulis dengan jelas dan dipasang di area cuci. Langkah-langkah dasar harus meliputi pembilasan awal, pencucian dengan deterjen laboratorium yang sesuai, pembilasan dengan air keran kemudian dengan air suling, pengeringan, dan pemeriksaan untuk memastikan bahwa semua deterjen sudah hilang.

Semua pipet harus direndam tegak lurus dalam larutan deterjen sehingga larutan mengisi bagian dalam pipet. Pipet kemudian dibilas selama sedikitnya 30 menit dengan air mengalir, kemudian dibilas dalam air suling. Piringan kaca yang digunakan untuk uji VDRL harus dibersihkan dengan seksama sampai semua deterjen dan residu minyaknya hilang. Hindari merendam lama dalam larutan deterjen karena dapat melunakkan dan mengelupaskan cincin keramik pada piringan. Piringan kaca dengan cincin parafin harus dibersihkan menggunakan pelarut organik yang sesuai (misalnya, bensin eter).

Pada uji RPR dan VDRL, digunakan jarum terkalibrasi untuk meneteskan antigen dan larutan pengencer. Perangkat uji RPR mencakup jarum penetes, dan jarum ini harus diperiksa sebelum dipakai. Periksalah jarum dengan menentukan jumlah tetesan/ml; jarum ukuran 20G harus meneteskan 90 tetes/ml. Jarum RPR yang tidak bekerja dengan baik harus dibuang. Setelah dipakai cucilah jarum dengan air suling. Untuk menyiapkan dua jarum pada uji VDRL, patahkan ujung jarum dengan tang. Periksalah jarum dengan menentukan jumlah tetesan/ml; jarum ukuran 18G harus meneteskan 60 tetes/ml dan jarum ukuran 21 atau 22G, 100 tetes/ml. Jarum pada perangkat uji VDRL yang tidak meneteskan jumlah tetesan yang tepat harus dibuang, atau disesuaikan dengan cara menekan atau melebarkan ujung jarum. Setelah digunakan cucilah jarum dengan air, alkohol 70%, dan aseton.

Reagen

Bahan kimia yang digunakan dalam serologi harus mempunyai mutu reagen dan harus memenuhi persyaratan untuk prosedur tersebut. Bahan ini harus disimpan sesuai dengan instruksi pabrik pembuatnya.

Gunakan air suling bermutu tinggi dengan pH 7,0 untuk pembuatan reagen. Air suling harus disimpan dalam botol kaca atau plastik yang tahan panas dengan tutup yang rapat serta diberi label dan tanggal dengan benar.

Larutan *saline* digunakan baik sebagai larutan saline maupun larutan berdapar, seperti *phosphate-buffered saline*. Pada iklim lembab, natrium klorida harus dikeringkan dalam oven udara panas selama 30 menit pada suhu 160–180° C untuk menghilangkan kelembaban. Garam dilarutkan dalam air suling atau air demineralisasi dan disimpan dalam botol kaca atau plastik tahan panas dengan tutup yang rapat dan diberi label serta tanggal dengan benar. Jika membuat larutan garam berdapar, pH larutan tersebut harus ditentukan sebelum dipakai.

Serum yang mengandung partikel kotoran harus disentrifugasi pada kecepatan 3000g selama 10 menit, dan supernatannya digunakan untuk pemeriksaan. Serum yang hemolisis atau terkontaminasi harus dibuang. Jika diperlukan serum yang tidak aktif, panaskan serum pada suhu 56° C selama 30 menit. Jika serum tersebut tidak digunakan dalam 4 jam setelah inaktivasi awal, inaktifkan ulang dengan pemanasan pada suhu 56° C selama 10 menit sebelum diperiksa. Semua serum harus dibiarkan mencapai suhu ruang sebelum pemeriksaan.

Penjabaran rinci mengenai beberapa prosedur serologis yang dikerjakan secara rutin di banyak laboratorium medis akan dibahas dalam bab ini. Prosedur tersebut mencakup uji serologis untuk pemeriksaan sifilis, uji Wright untuk diagnosis bruselosis, dan uji anti-streptolisin O untuk diagnosis penyakit pascainfeksi streptokokus.

Tiap penjabaran merujuk pada penggunaan perangkat uji komersial. Oleh karena perangkat-perangkat tersebut disediakan oleh berbagai pabrik pembuat, pengguna perangkat harus membaca petunjuk rinci yang terkandung dalam tiap brosur kemasan dengan teliti.

Reaksi serologis

Reaksi flokulasi atau presipitin

Pada uji flokulasi, antigen berada dalam bentuk larutan dan interaksi dengan antibodi akan menghasilkan pembentukan presipitat, yang dapat dilihat baik dengan mikroskop atau dengan mata telanjang. Pada saat reagen dicampur, kombinasi awal antigen dan antibodi terjadi hampir segera setelahnya. Walaupun demikian, pembentukan gumpalan lanjut yang lebih besar dan terlihat memerlukan waktu satu jam atau lebih, juga tergantung pada suhu. Reaksi tersebut paling cepat dalam zona keseimbangan, dengan perbandingan antigen dan antibodi yang optimal. Tabung dengan pembentukan presipitat tercepat merupakan petunjuk adanya keseimbangan yang baik. Uji flokulasi yang paling banyak digunakan adalah uji VDRL dan RPR. Keduanya digunakan untuk diagnosis sifilis (yang disebabkan oleh *Treponema pallidum*), dan infeksi treponema lain.

Uji flokulasi memberikan bukti kualitatif adanya reaksi antigen-antibodi, tetapi tidak menunjukkan apakah hanya satu jenis reaksi antigen-antibodi yang terlibat atau lebih. Walaupun demikian, jika reaksi tersebut diamati menggunakan gel semi-padat, antigen dan antibodi yang berbeda kemungkinan berdifusi dengan kecepatan migrasi yang berbeda, dan mungkin dapat membedakan reaksi yang berbeda.

Reaksi aglutinasi

Pada uji aglutinasi, reagen, yang dapat berupa antigen atau antibodi, difiksasi atau diserap pada mikropartikel. Berbagai partikel dapat digunakan sebagai pembawa reagen, misalnya partikel lateks, partikel gelatin, *microbeads*, bakteri, atau eritrosit. Teknik ini disebut juga aglutinasi pasif. Jika eritrosit digunakan sebagai pembawa, uji ini disebut uji koaglutinasi. Jika dicampur dengan antiserum spesifik, sel atau partikel membentuk jaringan anyaman (*lattice*) yang menyebabkan penggumpalan dan meninggalkan supernatan yang jernih. Jika digunakan antiserum yang spesifitasnya diketahui, dapat dilakukan uji untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang belum diketahui atau antigenya. Uji ini dapat dikerjakan pada kaca objek, dan aglutinasi yang terjadi dibaca secara makroskopik atau dengan mikroskop pembesaran objektif rendah. Reaksi aglutinasi juga digunakan untuk memperkirakan titer aglutinin antibakteri dalam serum pasien yang mengidap penyakit yang belum diketahui. Peningkatan titer selama sakit sangat mengindikasikan suatu hubungan sebab akibat.

Aglutinasi dipercepat pada suhu yang lebih tinggi (35–56° C) dan dengan pergerakan (misalnya, menggoyang, mengaduk, atau sentrifugasi) yang meningkatkan kontak antara antigen dan antibodi. Proses aglutinasi memerlukan garam. Suatu masalah yang berpotensi serius pada uji aglutinasi adalah reaksi prozone: jika terdapat terlalu banyak antibodi, anyaman tidak akan terbentuk dan akan terjadi hambatan aglutinasi. Reaksi prozone memberi kesan bahwa tidak ada antibodi; walaupun demikian, kesalahan ini dapat dicegah dengan menguji pengenceran serum serial.

Uji aglutinasi yang sering dipakai menggunakan *Staphylococcus aureus*, yang mengandung suatu protein, yaitu protein A, pada permukaannya. Protein ini berikatan dengan fragmen Fc pada antibodi IgG. Stafilocokus yang bersalut (*coated*) antibodi IgG menghasilkan aglutinasi yang tampak bila terdapat suatu antigen yang spesifik. Uji ini terutama digunakan untuk mengidentifikasi organisme yang dibiakkan dari spesimen klinis atau untuk mendeteksi antigen bakteri dalam cairan tubuh pasien yang terinfeksi (cairan serebrospinal pada kasus meningitis).

Uji aglutinasi digunakan untuk diagnosis virus Epstein-Barr (mononukleosis infeksiosa), rotavirus, rubella, dan untuk deteksi antigen bakteri (di antaranya *Haemophilus* serta *Streptococcus A* dan B).

Uji antibodi fluoresen

Pada uji imunofluoresensi, imunoreagen (antigen atau antibodi) dilekatkan pada pewarna fluoresen, seperti fluoresin dan rhodamin, dan reaksi antara antigen dan antibodinya dideteksi dengan mikroskop fluoresen. Pada uji deteksi antigen langsung, antibodi yang berkonjugasi dengan fluoresin digunakan untuk menunjukkan adanya suatu antigen spesifik. Uji ini adalah alat bantu yang berguna untuk identifikasi cepat *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *Rickettsia spp*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila*, dan organisme-organisme lain dalam spesimen klinis.

Pada uji antibodi fluoresen tidak langsung (*indirect fluorescent antibody/IFA*), pengenceran serial serum pasien dibiarkan bereaksi dengan antigen spesifik, dan ditambah dengan antibodi IgG atau IgM manusia yang dikonjugasikan pada fluoresin supaya reaksinya dapat terlihat. Sebagai contoh, pada serodiagnosis sifilis, antigen *Treponema pallidum* difiksasi pada kaca objek, ditetaskan serum pasien di atasnya, kemudian dicuci. Anti-imunoglobulin manusia yang berlabel fluoresin kemudian diletakkan di atas sedian tersebut, dicuci, dan diperiksa dengan mikroskop fluoresen. Jika serum pasien mengandung antibodi spesifik terhadap *Treponema pallidum*, akan tampak spirochaeta yang berfluoresensi terang. Jika spirochaeta tidak berfluoresensi, artinya tidak ada antibodi antitreponema yang spesifik dalam serum pasien tersebut. Uji IFA ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri lain, termasuk *Mycobacterium*, dan prosedur ini sering kali lebih spesifik dibandingkan uji imunofluoresensi langsung karena lebih banyak antibodi berlabel fluoresin yang terikat pada setiap situs antigen.

Uji serologis untuk sifilis

Uji serologis untuk diagnosis sifilis mencakup uji non-treponemal dan treponemal. Uji non-treponemal adalah uji VDRL dan RPR. Antigen yang digunakan dalam uji tersebut dibuat dari antigen non-treponema, seperti kardioliipin-lesitin, dan uji ini mendeteksi zat mirip antibodi yaitu *reagin*, yang terdapat dalam serum banyak pasien penderita sifilis, dan kadang-kadang dapat terdeteksi dalam serum pasien dengan penyakit akut atau kronik lainnya. Uji-uji ini praktis, murah, dan *reproducible*, walaupun tidak sepenuhnya spesifik. Uji tersebut dapat memastikan diagnosis sifilis simptomatik dini atau lanjut, atau memberikan bukti diagnostik adanya sifilis laten. Uji non-treponemal lebih unggul daripada uji treponemal sebagai pemeriksaan *follow-up* setelah pengobatan. Lagipula, uji VDRL merupakan alat yang efektif dalam penelitian epidemiologis untuk sifilis dan penyakit treponema lainnya.

Uji treponemal menggunakan antigen *Treponema pallidum* untuk mendeteksi antibodi spesifik yang terbentuk dalam serum sebagai respon terhadap infeksi sifilis. Prosedur tersebut digunakan untuk memastikan spesifisitas reaksi positif pada uji non-treponemal. Uji absorpsi antibodi treponema fluoresen (FTA-Abs) dan uji hemaglutinasi *Treponema pallidum* (TPHA) sangat spesifik dan sensitif, tetapi tidak dapat membedakan antara infeksi sifilis aktif dengan infeksi sifilis lampau, dan tidak dapat digunakan untuk menilai respon terapi.

Uji VDRL

Uji VDRL menggunakan partikel kolesterol yang bersalut kardioliipin-lesitin. Serum atau cairan otak yang diinaktifkan dicampur dengan emulsi antigen VDRL menggunakan mesin pemutar selama waktu yang telah ditentukan. Partikel VDRL akan berflokulasi jika terdapat *reagin* dalam serum atau cairan otak.

Uji VDRL bereaksi kuat pada infeksi sifilis dini. Setelah pengobatan yang efektif, titer akan menurun secara bertahap dan biasanya menjadi non-reaktif dalam 1–2 tahun. Pada fase akhir penyakit, serum dapat tetap reaktif dengan titer yang rendah (misalnya, 1:8 atau kurang) selama bertahun-tahun, bahkan setelah pengobatan yang efektif. Reaktivitas dapat menurun secara spontan pada sekitar 20–30% pasien yang tidak diobati selama fase laten penyakit, dan bahkan lebih sering lagi selama fase lanjut.

Hasil positif palsu dapat ditemukan karena kemiripan antigen VDRL dengan jaringan pejamu yang normal. Walaupun reaksi positif palsu kadang-kadang dapat ditemukan pada serum orang sehat, reaksi ini sering dikaitkan dengan penyakit tertentu atau setelah vaksinasi. Reaksi positif palsu yang akut seringkali bertiter rendah (1:8 atau kurang) dan terutama dijumpai pada orang-orang dengan infeksi virus atau bakteri (pneumonia atipik, psittakosis, mononukleosis infeksiosa dan hepatitis infeksiosa), selama kehamilan atau tak lama setelah vaksinasi. Reaksi positif palsu yang bertahan lama biasanya mempunyai titer tinggi yang disebabkan oleh autoantibodi (faktor reumatoid) pada pasien-pasien dengan lepra lepromatosa, tuberkulosis, kelainan imun (misalnya, lupus eritematosus, kolagenosis, penyakit rematik, sindrom Sjögren, disgamaglobulinemia) dan kadang-kadang malaria, atau pada orang dengan ketergantungan heroin. Uji VDRL reaktif atau reaktif lemah jangan dianggap bukti konklusif sifilis pada pasien, dan uji VDRL yang non-reaktif semata tidak menyingkirkan diagnosis sifilis. Oleh karena itu, setiap sampel uji yang memberikan hasil reaktif atau reaktif lemah tanpa adanya bukti klinis sifilis harus diuji dengan uji treponemal seperti FTA-Abs atau TPHA.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat uji VDRL

Larutan salin berdapar.

Set serum kontrol (non-reaktif, reaktif lemah, dan reaktif)

Antigen VDRL

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk uji VDRL

Alkohol absolut dan aseton

Slide untuk aglutinasi, kira-kira ukuran $5 \times 7,5$ cm dengan sumur-sumur berdiameter 16 mm dan dalam 1,75 mm, untuk uji cairan otak

Vial untuk *aliquot*

Air suling atau deionisasi

Piringan kaca dengan 12 cincin keramik atau parafin berdiameter sekitar 14 mm untuk uji serum

Tutup untuk menjaga kelembaban

Jarum hipodermik tanpa bevel: 18 G untuk uji serum dan 21 atau 22 G untuk uji cairan otak

Pengukur interval waktu

Mikroskop cahaya dengan okuler $10\times$ dan obyektif $10\times$

Pemusing mekanik, yang memutari lingkaran berdiameter 2 cm dengan kecepatan 180 putaran/menit, pada bidang datar dengan pengukur waktu otomatis

pH meter

Pipet serologis: 5,0 ml, 1,0 ml, dan 0,2 ml

Larutan saline steril (0,85% dan 10%)

Spuut, jenis Luer, 1 atau 2 ml

Botol emulsi antigen VDRL, 30 ml, bulat, bertutup kaca, bermulut sempit, berdiameter sekitar 35 mm dengan permukaan bawah yang rata di bagian dalamnya

Penangas air (56°C)

Rehidrasi antigen VDRL dan serum kontrol

Antigen VDRL adalah larutan lipid (kardiolipin dan lesitin) dan kolesterol dalam alkohol. Zat-zat tersebut tidak larut dalam air. Antigen VDRL bersifat tidak stabil dan suspensi yang segar harus dibuat pada hari pemeriksaan. Tuangkan isi ampul antigen ke dalam vial penyimpanan. Pastikan vial tertutup rapat dan disimpan dalam gelap pada suhu $15-30^{\circ}\text{C}$. Ambil antigen seperlunya.

Setelah botol larutan saline berdapar dibuka, botol tersebut harus disimpan dalam lemari es. Buanglah jika tampak keruh.

Rehidrasi serum kontrol dengan 3 ml air suling atau deionisasi. Bagilah kelebihan serum yang telah diairi tersebut menjadi *aliquot* dengan porsi yang sesuai (untuk pemakaian sehari) dan simpan pada suhu -20°C sampai selama satu bulan. Jangan mencairkan dan membekukan kembali. Simpan serum yang akan digunakan untuk hari tersebut dalam lemari pendingin pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.

Pembuatan emulsi antigen VDRL

1. Biarkan antigen dan larutan saline berdapar mencapai suhu ruang. Periksa pH larutan saline berdapar dan buanglah jika keluar dari kisaran $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$.
2. Pipetkan 0,4 ml larutan saline berdapar ke dalam botol emulsi antigen dan miringkan botol tersebut perlahan-lahan sehingga larutan saline berdapar menutupi bagian bawah botol.
3. Takar 0,5 ml larutan antigen dengan menggunakan pipet 1 ml yang berskala sampai ke ujungnya, dan tambahkan antigen sebagai berikut:
 - Pertahankan pipet pada sepertiga atas botol, jangan biarkan menyentuh larutan saline.
 - Sambil memutar botol dengan tangan dalam lingkaran berdiameter sekitar 5 cm, tambahkan antigen setetes demi setetes ke dalam larutan saline berdapar.
 - Berikan waktu sekitar 6 detik untuk menambahkan antigen, kemudian keluarkan sisa antigen dalam pipet ke dalam botol.
 - Teruskan memutar botol selama 10 detik.
4. Tambahkan 4,1 ml larutan saline berdapar ke dalam botol, biarkan larutan mengalir pada dinding botol.
5. Pasang tutup kaca pada botol dan guncangkan botol ke atas dan ke bawah sekitar 30 kali dalam 10 detik.
6. Biarkan emulsi antigen selama sedikitnya 10 menit sebelum dipakai. Putar perlahan sebelum dipakai. Emulsi antigen dapat digunakan sampai 8 jam ke depan.
7. Jika akan menguji cairan otak, encerkan emulsi antigen lebih lanjut 1:2 dengan larutan saline 10% dengan volume yang sama. Kocok botol perlahan selama 10 detik dan biarkan selama sedikitnya 5 menit dan paling lama 2 jam sebelum dipakai.

Uji VDRL kualitatif

1. Dengan menggunakan pipet 1,0 ml, campur serum yang sudah diinaktifkan beberapa kali, kemudian tambahkan 0,05 ml ke dalam sumur pertama pada lempeng kaca VDRL.
2. Sebarkan serum dengan gerakan memutar ujung pipet sehingga serum menutupi seluruh permukaan dalam sumur parafin atau keramik tersebut. Gunakan lempeng yang bersih saja supaya serum dapat menutup seluruh permukaan dalam sumur parafin atau keramik tersebut.
3. Ambillah spuit dengan jarum berukuran 18 G dan sambil memegangnya dalam posisi tegak, tambahkan 1 tetes antigen (1/60 ml) ke dalam serum secara hati-hati. Jangan biarkan jarum menyentuh serum.
4. Letakkan piring pada pemusing mekanik dengan tutup kelembaban terpasang dan putar selama 4 menit. Jika pemusing mekanik tidak tersedia, putarlah kartu dengan tangan dengan gerakan memutar konstan selama 4 menit.
5. Periksa lah piringan segera setelah pemutaran menggunakan mikroskop dengan okular 10× dan obyektif 10×
6. Bacalah reaksi sebagai berikut:

Gumpalan sedang dan besar	R	Reaktif
Gumpalan kecil	W	Reaktif lemah
Tidak ada gumpalan atau kekeruhan yang sangat ringan	N	Non-reaktif

Serum yang memberi hasil reaktif-lemah atau non-reaktif harus diuji ulang dengan uji semi kuantitatif karena kadang-kadang ditemukan reaksi prozone.

Uji VDRL semi-kuantitatif

1. Siapkan pengenceran serum yang telah diinaktifkan secara serial dua kali lipat dengan larutan saline 0,85% (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)
2. Ujilah setiap pengenceran serum dengan menggunakan prosedur uji kualitatif.
3. Laporkan hasilnya, yaitu pengenceran serum tertinggi yang memberi hasil reaktif (bukan reaktif-lemah) sesuai dengan contoh di bawah ini:

Serum yang tidak diencerkan	Pengenceran					Laporan
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
W	N	N	N	N	N	Reaktif lemah, tidak diencerkan
R	W	N	N	N	N	Reaktif, tidak diencerkan
R	R	W	N	N	N	Reaktif, pengenceran 1:2
R	R	R	W	N	N	Reaktif, pengenceran 1:4
W	W	R	R	W	N	Reaktif, pengenceran 1:8
N(keruh)	W	R	R	R	N	Reaktif, pengenceran 1:16

W: reaktif lemah; R: reaktif; N: non reaktif

4. Jika hasil reaktif ditemukan sampai pengenceran 1:32, buat pengenceran serial dua kali lipat dalam larutan saline 0,85% (1:64, 1:128 dan 1:256) dan ujilah dengan menggunakan prosedur uji kualitatif.

Uji RPR

Suspensi antigen dalam uji RPR mengandung partikel arang yang memungkinkan terjadinya flokulasi yang terlihat secara makroskopik. Perbedaan utama antara uji RPR dengan VDRL yaitu RPR menggunakan antigen yang telah distabilkan, menggunakan kartu dan bukan piringan, menggunakan serum selain juga plasma, dan serumnya tidak perlu dipanaskan. Karena hanya sedikit sampel yang diperlukan, dapat juga digunakan plasma atau serum dari darah kapiler. Uji RPR tidak dapat digunakan untuk menguji cairan otak.

Pada uji RPR, antigen sudah siap untuk dipakai segera. Antigen tidak perlu dibuat atau diencerkan sebelumnya. Reagen antigen yang belum dibuka mempunyai masa simpan satu tahun; dianjurkan untuk menyimpannya di lemari pendingin. Begitu dibuka, reagen antigen mempertahankan reaktivitasnya selama 3 bulan jika disimpan dalam lemari pendingin dalam dispenser plastiknya. Uji RPR sedikit lebih sensitif daripada VDRL dan lebih mudah serta cepat pengerjaannya. Reaksi positif palsu terjadi sedikit lebih sering pada uji RPR dibanding VDRL. Beberapa perangkat komersial memerlukan pemusing mekanik untuk mencampur reagen, sedangkan perangkat lainnya dapat diputar secara manual.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat uji RPR

Jarum penetes antigen untuk meneteskan 60 tetes/ml suspensi antigen

Serum kontrol, positif dan negatif

Penetes sekali pakai untuk meneteskan 50 µl serum atau plasma

Kartu uji RPR yang berlapis plastik, masing-masing dengan dua baris yang terdiri dari lima sumur

Suspensi antigen RPR yang sudah disiapkan

Pengaduk

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk uji RPR

Penetes sekali pakai

Pensil lilin

Tutup untuk menjaga kelembaban (*humidity cover*)

Pemusing mekanik, memutar lingkaran berdiameter 2 cm dengan kecepatan 180 putaran/menit pada bidang datar, dengan pengukur waktu otomatis

Larutan saline steril (0,85%)

Uji RPR kualitatif

1. Keluarkan perangkat reagen dari lemari pendingin dan biarkan reagen menghangat sampai mencapai suhu ruang.
2. Kembalikan serum kontrol ke kondisi semula dengan menambahkan air suling sesuai volume anjuran.
3. Setiap sumur pada kartu RPR diberi label menggunakan nomor laboratorium sampel yang akan diuji, termasuk sumur untuk serum kontrol positif, positif lemah dan negatif.
4. Gunakan penetes sekali pakai untuk menambahkan 50 µl serum atau plasma yang tidak dipanaskan ke sumur yang bersesuaian. Gunakan penetes baru untuk tiap sampel.
5. Kocok suspensi antigen perlahan-lahan dan tambahkan satu tetes yang jatuh bebas ke tiap sumur dengan menggunakan jarum penetes antigen yang telah disediakan. Campurlah suspensi antigen dan serum dengan hati-hati. Gunakan pengaduk baru untuk tiap sampel. Lebarakan sampai menutup area sumur.
6. Tempatkan kartu pada pemusing mekanik dengan *humidity cover* terpasang dan putar selama 8 menit. Jika tidak tersedia pemusing mekanik, putar kartu dengan tangan dengan gerakan memutar konstan selama 2 menit, kemudian letakkan dalam cawan lembab yang mengandung tisu atau kertas saring basah selama 6 menit. Angkat kartu dan putar sebentar untuk mendapatkan pembacaan akhir. Hati-hati jangan sampai terjadi kontaminasi silang antarsampel.
7. Angkat kartu dari pemusing dan periksalah secara makroskopik di bawah cahaya yang cukup. Serum kontrol positif harus menunjukkan aglutinasi yang tampak jelas. Serum kontrol negatif harus menunjukkan tidak adanya aglutinasi. Pemutaran singkat dan pemiringan kartu sedikit dengan tangan dapat membantu membedakan sampel yang reaktif lemah dari sampel yang non-reaktif.
8. Catat hasil uji:
 - Gumpalan flokulasi kecil sampai besar: reaktif
 - Kekeruhan suspensi partikel yang merata: non-reaktif
9. Siapkan pengenceran serial bagi serum yang reaktif untuk memperkirakan titer antibodi.

Uji RPR semi kuantitatif

1. Keluarkan perangkat reagen dari lemari pendingin dan biarkan reagen menghangat sampai mencapai suhu ruang.
2. Beri label sebaris kartu RPR yang terdiri atas 5 sumur dengan nomor laboratorium sampel yang akan diuji.
3. Gunakan penetes sekali-pakai untuk menambahkan 1 tetes larutan saline (0,85%) ke tiap sumur. Jangan dilebarkan.
4. Gunakan penetes baru untuk menambahkan 1 tetes sampel serum ke sumur pertama. Campur dengan cara menarik dan menekan penetes 5–6 kali (hindari terbentuknya gelembung).
5. Pindahkan 50 μ l sampel yang telah tercampur (pengenceran 1:2) ke sumur berikutnya. Campur. Ulangi prosedur tersebut sampai sumur ke-5 (pengenceran 1:32). Buang 50 μ l dari pengenceran terakhir.
6. Lebarkan sampel yang telah diencerkan ke seluruh area sumur uji dimulai dari pengenceran yang terbesar. Gunakan pengaduk baru untuk tiap sampel.
7. Kocok suspensi antigen dengan perlahan-lahan dan tambahkan satu tetes yang jatuh bebas ke tiap sumur dengan menggunakan jarum penetes antigen yang telah disediakan. Campurlah suspensi antigen dan serum dengan hati-hati. Gunakan pengaduk baru untuk tiap sampel. Lebarkan sampai menutup area sumur.
8. Tempatkan kartu pada pemusing mekanik dibawah *humidity cover* dan putar selama 8 menit. Jika tidak tersedia pemusing mekanik, putar kartu dengan tangan dengan gerakan memutar yang konstan selama 2 menit, kemudian letakkan dalam cawan lembab yang mengandung tisu atau kertas saring basah selama 6 menit. Angkat kartu dan putar sebentar untuk mendapatkan pembacaan akhir. Hati-hati jangan sampai terjadi kontaminasi silang antara-sampel.
9. Angkat kartu dari pemusing dan periksalah secara makroskopik di bawah cahaya yang cukup. Pengenceran tertinggi yang mengandung aglutinasi makroskopik adalah titer sampel tersebut.
10. Jika sampel positif pada pengenceran 1:32, seri pengenceran harus diperluas. Buat pengenceran 1:16 dalam larutan saline (0,85%) dan lakukan pengenceran serial seperti yang dijabarkan di atas.

Uji absorpsi antibodi treponema fluoresen (FTA-Abs)

Antigen yang digunakan untuk uji FTA-Abs terdiri dari *Treponema pallidum* (galur Nichols) yang difiksasi dengan aseton pada kaca objek. Sel-sel *T. pallidum* yang diliofilisasi dan dicairkan kembali dalam larutan saline juga dapat digunakan. Serum pasien yang telah diinaktivasi diinkubasi dengan menggunakan penyerap yang terdiri dari treponema Reiter untuk absorpsi antibodi kelompok treponema yang non-spesifik. Setelah absorpsi, serum pasien ditambahkan ke kaca objek tersebut. Antibodi spesifik dalam serum mengikat permukaan sel-sel treponema. Setelah pembilasan, tambahkan konjugat antibodi anti-manusia dengan pewarna fluoresen (fluoresin isotiosianat) pada treponema. Konjugat akan berikatan dengan antibodi yang telah berikatan dengan treponema dan dapat dilihat dengan mikroskop fluoresen.

Reaktivitas dapat diamati tiga minggu setelah infeksi dan menetap pada pasien yang tidak diobati. Reaktivitas dapat ditemukan beberapa tahun setelah pengobatan yang berhasil pada fase awal penyakit dan dapat menetap pada pasien-pasien yang mendapatkan terapi obat yang adekuat hanya pada fase lanjut penyakit. Reaksi positif pada uji FTA-Abs menunjukkan kemungkinan infeksi sifilis yang besar. Hasil negatif palsu sangat jarang dan mungkin disebabkan oleh antigen yang bermutu rendah. Hasil positif palsu dapat disebabkan oleh kelompok antibodi yang tidak tersingkir selama prosedur absorpsi atau oleh reagen yang tidak memuaskan. Hasil positif palsu juga telah dilaporkan pada pasien-pasien dengan sirosis hepatitis, balanitis, kolagenosis, herpes gestasionis, lupus eritematosus, dan sangat jarang pada wanita hamil dan orang sehat (penyebabnya belum diketahui).

Reaktivitas silang antara *T. pallidum* dengan *Borrelia burgdorferi* (penyakit Lyme) telah dibuktikan. Secara khusus, spesimen dengan titer antibodi uji FTA-Abs yang tingginya tidak proporsional dibandingkan uji serologis sifilis lainnya, harus dilakukan pemeriksaan antibodi terhadap *Borrelia*.

Keunggulan utama uji FTA-Abs adalah spesifisitas dan sensitivitasnya yang tinggi, serta onset reaktivitas yang dini. Hasilnya dapat dipercaya dan dapat menentukan dalam kasus-kasus yang meragukan. Walaupun demikian, uji FTA-Abs memakan waktu dan mahal; uji ini memerlukan personel yang sangat terlatih untuk melaksanakan dan membaca hasilnya. Oleh karena itu, uji ini sebaiknya hanya digunakan sebagai uji konfirmasi untuk kasus-kasus dengan diagnosis yang meragukan.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat uji FTA-Abs

Larutan dapar
Serum kontrol, positif dan negatif
Anti imunoglobulin manusia yang berlabel fluoresin (konjugat)
Ekstrak treponema Reiter yang diliofilisasi (penyerap)
Hapusan *T. pallidum* yang difiksasi pada kaca objek

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk uji FTA-Abs

Kaca penutup
Mikroskop fluoresen dengan lampu UV (objektif 40×)
Media untuk *mounting*
Larutan saline berdapar fosfat, pH 7,2 (PBS)
Tween 80 (2%)-PBS

Uji FTA-Abs

1. Keluarkan perangkat reagen dari lemari pendingin dan biarkan reagen menghangat hingga mencapai suhu ruang.
2. Biarkan sejumlah kaca objek yang diperlukan menghangat sampai mencapai suhu ruang selama 15 menit.
3. Encerkan 50 µl serum dengan 0,2 ml penyerap dan campur. Encerkan kontrol positif dan negatif secara paralel, 1:5 dalam larutan dapar dan 1:5 dalam penyerap.
4. Tutupi sediaan hapus pada satu kaca objek dengan 10 µl larutan dapar (kontrol konjugat) dan sediaan pada kaca objek kedua dengan 10 µl penyerap (kontrol penyerap).
5. Pada kaca objek yang tersisa, tutupi hapusan dengan 10 µl serum yang diencerkan dan 10 µl serum kontrol yang diencerkan.
6. Letakkan kaca objek pada ruang yang lembab selama 30 menit pada suhu 37° C. Cucilah kaca objek selama 5 menit dalam larutan Tween-PBS. Ulangi tiap pencucian. Bilas dalam air suling, kemudian tiriskan, dan biarkan mengering dalam kotak slide.
7. Tutupi hapusan pada semua kaca objek dengan 10 µl anti-imunoglobulin manusia yang dilarutkan dalam larutan dapar sesuai petunjuk pabrik pembuat.
8. Letakkan kaca objek pada ruang yang lembab selama 30 menit pada suhu 37° C. Cucilah kaca objek selama 5 menit dalam Tween-PBS. Ulangi tiap pencucian. Bilas dalam air suling, kemudian tiriskan dan biarkan mengering dalam kotak kaca objek.
9. Tutupi tiap hapusan dengan 2 tetes media *mounting* dan kaca penutup.
10. Pastikan kontrol konjugat, penyerap, dan kontrol serum negatif tidak berfluoresensi:
 - Tidak ada fluoresensi atau treponema yang agak kehijauan: reaksi negatif
 - Fluoresensi hijau dengan derajat yang bervariasi: reaksi positif

Derajat fluoresensi dapat digolongkan sebagai:

Non reaktif	0
Borderline	1+, 2+, 3+
Reaktif	4+

Reaksi 2+ atau lebih mengindikasikan adanya infeksi *T. pallidum*.

Uji aglutinin pada demam (*Febrile agglutinins test*)

Dokter yang merawat pasien-pasien dengan demam yang tidak bisa dijelaskan sering meminta serangkaian pemeriksaan serologis, yang secara kolektif dikenal sebagai uji aglutinin pada demam,

untuk menunjukkan infeksi *Brucella* (uji Wright), *Salmonella typhi* (uji Widal), dan beberapa riketsia (reaksi Weil-Felix). Uji-uji tersebut mengukur antibodi aglutinasi terhadap antigen permukaan O dan/ atau antigen flagela H organisme yang dicurigai, atau pada reaksi Weil-Felix terhadap antigen permukaan dua galur *Proteus vulgaris* yang bereaksi silang.

Uji Widal dan Weil-Felix tidak lagi dianjurkan untuk skrining pasien karena menyebabkan sejumlah besar masalah teknis dan interpretasi. Reaksi negatif tidak menyingkirkan infeksi aktif karena infeksi mungkin berada dalam masa inkubasi dan pasien belum menghasilkan antibodi yang dapat dideteksi terhadap organisme tersebut. Fenomena prozone juga menyebabkan reaksi yang negatif; ini dapat dicegah dengan menggunakan pengenceran serum secara serial. Reaksi positif dengan antigen tertentu mungkin tidak bersifat diagnostik karena pasien mungkin menunjukkan peningkatan kadar aglutinin heterolog selama perjalanan penyakit. Reaksi demikian dikenal sebagai reaksi anamnestic non-spesifik karena pasien telah merespon terhadap rangsang antigen dengan menghasilkan aglutinin non-spesifik. Ini menyebabkan diagnosis serologis yang berdasarkan satu kali peninggian titer antibodi menjadi terlalu tidak pasti, dan hanya serokonversi dengan peningkatan titer empat kali lipat atau lebih pada pengenceran serum secara serial yang dapat diterima sebagai indikasi adanya infeksi baru.

Kebanyakan pasien dengan brucellosis akut akan mempunyai titer aglutinin 1:320 atau lebih pada akhir minggu kedua sakitnya. Bahkan satu tahun setelah pengobatan, 20% pasien akan tetap mempunyai titer aglutinin *Brucella* yang bermakna. Titer aglutinin *Brucella* yang tinggi juga telah dilaporkan pada pasien dengan infeksi *Francisella tularensis* dan *Yersinia enterocolitica*, dan pada pasien-pasien yang baru mendapat vaksinasi *Brucella* atau kolera atau telah diuji dengan uji kulit brucelergin. Titer tinggi juga kadang-kadang dilaporkan pada pekerja pejalagan.

Karena biakan darah mungkin tidak menunjukkan organisme selama berminggu-minggu, jika ada, penetapan aglutinin *Brucella* dapat mendukung diagnosis presumtif brucellosis akut. Isolasi organisme, biasanya dari darah, memberikan bukti pasti adanya infeksi. Walaupun demikian, pada kasus-kasus yang dicurigai dengan biakan darah yang negatif, aspirat sumsum tulang sternal dapat dibiakkan untuk memastikan diagnosis. Pasien-pasien dengan brucellosis lokal mungkin tidak demam dan mungkin tidak mempunyai titer aglutinin *Brucella* yang bermakna. Pada kasus-kasus tersebut, infeksi harus dicurigai berdasarkan epidemiologi dan adanya kelenjar getah bening yang berkalsifikasi pada foto rontgen, tetapi diagnosis harus dipastikan dengan biakan.

Uji cepat dengan kaca objek adalah uji skrining yang dirancang untuk mendeteksi aglutinin, sedangkan uji tabung adalah uji konfirmasi yang dirancang untuk mengukur aglutinin secara kuantitatif. Hasil positif yang didapat dengan uji kaca objek harus diverifikasi dengan uji tabung.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat febrile agglutinin test

Suspensi antigen (*B. abortus*, *B. melitensis*) dalam botol-botol yang dipasang tutup penetes
Serum kontrol negatif
Serum kontrol positif

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk febrile agglutinin test

Batang pengoles (lidi)
Piringan kaca
Pensil minyak
Pipet, 50–1000 µl
Penggaris
Larutan saline steril (0,85%)
Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
Pencatat waktu
Penangas air dengan suhu yang terkendali

Uji aglutinin demam dengan kaca objek

Uji ini lebih disukai daripada uji tabung karena lebih sederhana.

1. Sampel serum harus jernih dan bersih dari minyak yang tampak. Serum tidak boleh menunjukkan hemolisis atau tercemar bakteri. Serum jangan dinon-aktifkan dengan panas karena ini dapat merusak beberapa aglutinin yang termolabil.
2. Siapkan piringan kaca dengan menggambar baris-baris yang terdiri dari persegi ukuran 2,5 cm dengan penggaris dan pensil minyak. Tiap baris berisi 5 kotak yang cukup untuk menguji satu antigen terhadap pengenceran serum sampai 1:320.
3. Gunakan pipet 0,2 ml untuk menambahkan 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; dan 0,005 ml serum ke satu baris kotak pada piringan kaca.
4. Tempatkan 1 tetes suspensi antigen, yang sudah tercampur dengan baik untuk uji kaca objek, pada tiap tetes serum.
5. Campurlah campuran serum-antigen dengan batang pengoles, dimulai dari pengenceran serum tertinggi. Pengenceran terakhir kira-kira berkorelasi dengan pengenceran uji tabung makroskopik dan dihitung berturut-turut sebagai 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, dan 1:320.
6. Peganglah piringan kaca dengan kedua tangan dan putarlah perlahan-lahan 15–20 kali. Periksa-lah campuran serum-antigen secara makroskopik untuk melihat aglutinasi dalam 1 menit di bawah cahaya yang cukup. Reaksi yang terjadi lebih lambat mungkin disebabkan oleh reaktan yang mengering pada kaca objek dan harus diverifikasi dengan uji tabung.
7. Catat hasil sebagai berikut:

Aglutinasi sempurna	4+
Sekitar 75% sel menggumpal	3+
Sekitar 50% sel menggumpal	2+
Sekitar 25% sel menggumpal	1+
Trace atau tidak ada aglutinasi	–

Uji aglutinin demam dengan tabung

Buatlah pengenceran serum dan serum kontrol secara serial sebagai berikut:

1. Letakkan 8 tabung reaksi dalam rak untuk tiap serum yang akan diuji.
2. Pipetkan 1,9 ml larutan saline (0,85%) ke dalam tabung pertama tiap-tiap baris dan 0,5 ml ke dalam tabung sisanya.
3. Tambahkan 0,1 ml serum ke dalam tabung 1 yang mengandung 1,9 ml larutan saline.
4. Campur dengan baik menggunakan pipet dan pindahkan 0,5 ml ke tabung 2. Campur sampai merata.
5. Teruskan ke tabung berikut pada baris tersebut dengan menambah 1 tetes pengenceran serum sampai tabung ke 7. Campur dengan seksama. Buanglah 0,5 ml dari tabung 7 setelah mencampurnya dengan seksama. Tabung 8 adalah tabung kontrol antigen.
6. Tambahkan 0,5 ml antigen terkait ke masing-masing tabung. Goyangkan rak untuk mencampur antigen dan antiserum. Pengenceran yang dihasilkan, yaitu 1:20 sampai 1:1280 secara berurutan.
7. Inkubasi dalam penangas air bersuhu 37° C selama 48 jam atau sesuai dengan petunjuk pabrik pembuat.
8. Periksa-lah tabung secara makroskopik untuk melihat aglutinasi dalam 1 menit dengan cahaya yang cukup pada latar belakang hitam. Tabung jangan dikocok. Reaksi positif menunjukkan aglutinasi yang jelas (granulasi); reaksi negatif menunjukkan suspensi yang keruh tanpa aglutinasi. Pengenceran serum tertinggi dalam tabung yang menunjukkan aglutinasi adalah titernya.

Buanglah antigen jika tidak beraglutinasi dengan serum kontrol yang diketahui positif, atau jika beraglutinasi dengan serum kontrol yang diketahui negatif.

Aglutinin dapat ditemukan pada individu yang sehat; serum tunggal dengan titer kurang dari 80 mempunyai makna yang meragukan. Hasil positif palsu dapat ditemukan pada serum pasien yang terinfeksi *Francisella tularensis* atau divaksinasi terhadap *Vibrio cholerae*. Tidak mungkin membedakan infeksi *B. abortus* dengan *B. melitensis* menggunakan uji ini.

Uji anti-streptolisin O (ASO)

Infeksi streptokokus sangat sering ditemukan dalam semua populasi, dan persentase orang yang mempunyai antibodi terhadap streptokokus tinggi. Streptokokus β -hemolitikus grup A menghasilkan dua hemolisin: streptolisin O yang labil terhadap oksigen dan hemolisin S yang stabil terhadap oksigen. Hanya streptolisin O tereduksi (tidak teroksidasi) yang bersifat imunogenik dan digunakan pada uji ini. Uji anti-streptolisin O didasarkan pada fakta bahwa pasien-pasien dengan infeksi *Streptococcus pyogenes* (streptokokus grup A) menghasilkan antibodi yang menghambat aktivitas hemolitik streptolisin O. Antibodi tersebut biasanya bertahan lama dan satu peningkatan titer bukanlah indikasi infeksi saat ini. Hanya peningkatan titer empat kali lipat atau lebih pada serum yang diambil berturut-turut dengan selang 10–14 hari yang mengindikasikan adanya infeksi baru. Uji ini terutama digunakan dalam diagnosis demam rematik akut, glomerulonefritis akut, dan penyakit pasca infeksi streptokokal lain.

Terdapat dua jenis perangkat uji anti streptolisin O komersial:

- Uji aglutinasi lateks ASO kaca objek digunakan dalam pemeriksaan skrining serum untuk mengidentifikasi orang-orang dengan peningkatan titer ASO (200 IU atau lebih).
- Uji tabung ASO adalah uji inhibisi hemolisis yang digunakan untuk menentukan titer antibodi ASO dalam sampel serum yang positif pada uji aglutinasi lateks ASO kaca objek. Titer yang kurang dari 50 IU tidak memastikan diagnosis demam rematik akut.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat uji aglutinasi lateks ASO dengan kaca objek

Kartu sekali pakai; 6 sumur di setiap kartu
 Penetes sekali pakai
 Serum kontrol positif
 Reagen lateks yang disensitisasi (dengan streptolisin O)

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk uji aglutinasi lateks ASO dengan kaca objek

Batang pengoles

Uji aglutinasi lateks ASO dengan kaca objek

1. Encerkan serum 1:20.
2. Letakkan 1 tetes larutan serum pada sumur di kartu sekali pakai.
3. Gunakan penetes baru untuk menambahkan 1 tetes reagen lateks yang tersensitisasi.
4. Gunakan batang aplikator untuk mencampur kedua tetesan tersebut dan sebar pada keseluruhan sumur tersebut.
5. Periksa adanya aglutinasi dalam 2 menit.

Reaksi positif tampak sebagai flokulasi (aglutinasi) halus dalam 2 menit.

Reaksi negatif tidak menunjukkan aglutinasi.

Jika flokulasi tampak dalam 2 menit, serum harus dititrasi dengan uji tabung anti streptolisin O.

Bahan dan reagen yang tersedia dalam perangkat uji ASO dengan tabung

Serum kontrol positif
 Antigen streptolisin O yang tereduksi (preparat yang dikeringkan)
 Sel darah merah domba
 Antibodi anti streptolisin O baku (preparat yang dikeringkan, 20 IU/ botol)
 Dapar streptolisin O (larutan konsentrat 25×)

Bahan dan reagen tambahan yang diperlukan untuk uji ASO dengan tabung

Air suling
Pipet (1 ml, 2 ml)
Tabung reaksi
Penangas air

Uji ASO dengan tabung

1. Larutkan antigen streptolisin O tereduksi (preparat yang dikeringkan) dengan air suling dalam jumlah yang sesuai (tertera pada label botol) untuk menghasilkan kekuatan setara 2 IU per ml. Larutan harus digunakan dalam 6 jam setelah pelarutan karena tidak mengandung pengawet.
2. Larutkan antibodi anti-streptolisin O baku (preparat yang dikeringkan, 20 IU/ botol) dengan 10 ml dapar streptolisin O. Larutan tersebut dapat disimpan selama enam bulan pada 4° C asal tidak terkontaminasi.
3. Sebelum digunakan encerkan dapar streptolisin O (larutan konsentrat 25×) dengan 480 ml air suling. Dapar yang telah diencerkan harus dibuang setelah satu minggu.
4. Cuci dan sentrifugasi 1 ml eritrosit domba sebanyak tiga kali dalam dapar streptolisin O dan buang cairan supernatan dengan pipet. Tambahkan dapar streptolisin O untuk mendapatkan suspensi sel 8%.
5. Biarkan reagen dan sampel serum mencapai suhu ruangan.
6. Buatlah pengenceran serum pasien 1:10 dalam tabung reaksi (0,1 ml serum + 0,9 ml dapar streptolisin O). Buat 2 pengenceran utama (master) dari pengenceran 1:10 seperti yang tampak pada tabel di bawah ini:

Serum	Dapar	Pengenceran
0,2 ml (1:10)	1,8 ml	1:100
1,0 ml (1:100)	0,5 ml	1:150

7. Buatlah rangkaian pengenceran berikut dengan dapar streptolisin O untuk tiap pengenceran utama:

Tabung	Serum	Dapar	Pengenceran	Streptolisin O yang tereduksi
1	0,2 ml (1:10)	0,8 ml	1:50	0,5 ml
2	0,5 ml (1:100)	0,5 ml	1:200	0,5 ml
3	0,5 ml (1:200)	0,5 ml	1:400	0,5 ml
4	0,5 ml (1:400)	0,5 ml	1:800	0,5 ml
5	0,5 ml (1:150)	0,5 ml	1:300	0,5 ml
6	0,5 ml (1:300)	0,5 ml	1:600	0,5 ml
7	0	1,5 ml	—	0
8	0	1,0 ml	—	0,5 ml

8. Atur kembali tabung dari pengenceran yang terendah sampai tertinggi: 1:50, 1:200, 1:300, 1:400, 1:600, 1:800.
9. Tambahkan 1,5 ml dapar ke dalam tabung kontrol 7 dan 1 ml dapar ke dalam tabung kontrol 8.
10. Tambahkan 0,5 ml streptolisin O tereduksi ke dalam semua tabung reaksi, kecuali tabung kontrol 7.
11. Campur dan dinginkan pada suhu 4° C selama dua jam untuk membiarkan reaksi antibodi-antigen berlangsung.
12. Tambahkan 0,5 ml suspensi sel 8% ke dalam tiap tabung, termasuk tabung kontrol 7 dan 8, campur dan inkubasi dalam penangas air pada suhu 37° C selama 30 menit.

13. Sentrifugasi tabung dengan kecepatan 1000g selama 2 menit dan perhatikan adanya hemolisis. Tabung kontrol 7 tidak boleh menunjukkan hemolisis dan tabung kontrol 8 harus mengalami hemolisis sempurna.
14. Titer ASO ditentukan sebagai pengenceran tertinggi yang tidak menunjukkan tanda hemolisis:
 - Jika terdapat hemolisis pada semua tabung, laporkan hasil sebagai "titer ASO kurang dari 200 IU".
 - Jika tidak terdapat hemolisis pada tabung dengan pengenceran serum yang lebih tinggi, laporkan sebagai "ASO reaktif dengan titer tersebut".

Uji antigen bakteri

Uji aglutinasi lateks dan koaglutinasi untuk antigen bakteri digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme atau antigennya dalam biakan atau spesimen klinis. Uji aglutinasi lateks menggunakan partikel polimer sebagai penunjang fase padat; uji koaglutinasi menggunakan sel darah merah sebagai penunjang fase padat. Uji aglutinasi lateks tersedia untuk mendeteksi sejumlah antigen polisakarida yang berbeda pada bakteri penyebab meningitis, termasuk *Haemophilus influenzae* (tipe b), *S. pneumoniae* (omnivalen), *N. meningitidis* (grup A, B, C, Y, dan W135), *E. coli* (tipe K1) dan *S. agalactiae* (grup B). Uji aglutinasi lateks berguna untuk mengidentifikasi streptokokus dari grup Lancefield A, B, C, D, F, dan G. Lagipula, serum yang mengaglutinasi lateks tersedia untuk digunakan dalam uji aglutinasi kaca objek kualitatif dan uji aglutinasi tabung kuantitatif untuk identifikasi serologis dan penentuan tipe *Streptococcus* grup A-D, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, dll.

Untuk mendeteksi antigen polisakarida dalam sampel klinik harus didapatkan antigen dalam kadar ambang. Ambang batas biasanya terlewati bila organisme dapat ditemukan dalam sedimen pulsan Gram, walaupun ini tidak selalu terjadi. Jumlah bakteri yang ditemukan dalam cairan otak pasien-pasien yang terinfeksi *N. meningitidis* nyata-nyata lebih rendah daripada yang terinfeksi *Neisseria* spp. jenis lain sehingga, kadar ambang antigen polisakarida lebih jarang tercapai.

Beberapa serogrup *N. meningitidis* dapat menyebabkan meningitis. Serogrup A, C, Y, dan W135 masing-masing mempunyai antigen stabil yang dapat dideteksi dengan reagen polivalen tunggal, sedangkan antigen serogrup B relatif tidak stabil dan jauh lebih sulit dideteksi. Antigen tersebut juga tidak dapat dibedakan dengan antigen polisakarida K1 *E. coli*, yang merupakan penyebab utama meningitis *E. coli* pada bayi baru lahir. Walaupun demikian, jika sedimen pulsan Gram menunjukkan diplokokus Gram negatif, infeksi kemungkinan besar disebabkan oleh *N. meningitidis* grup B; jika sedimen pulsan Gram menunjukkan batang Gram negatif, infeksi kemungkinan disebabkan oleh *E. coli*.

Pada beberapa uji, antigen polisakarida diekstraksi dari organisme sebelum dilakukan pemeriksaan. Ekstraksi ini dapat dikerjakan secara kimiawi atau enzimatik. Terdapat empat uji berbeda yang dapat digunakan untuk mendeteksi antigen:

- Pada uji aglutinasi kaca objek, antigen ditambahkan ke partikel lateks atau sel-sel stafilokokus yang berlapis antibodi spesifik. Campuran tersebut diputar dengan tangan dengan gerakan memutar yang konstan selama 1–2 menit dan reaksi diamati secara makroskopik untuk melihat adanya aglutinasi.
- Pada uji ELISA, larutan sampel dan antigen dilewatkan melalui membran yang berlapis antibodi (antibodi ini biasanya monoklonal). Selanjutnya, membran dilapisi dengan larutan antibodi monoklonal kedua yang terkonjugasi dengan enzim. Adanya kompleks antigen-antibodi enzim pada membran dideteksi dari reaksinya dengan substrat kromogenik yang ditambahkan dalam larutan.
- Pada *gold immunoassay*, larutan sampel dan antigen dibiarkan berdifusi pada suatu membran, yang kemudian diperiksa.
- Pada *optical immunoassay*, antibodi dilekatkan pada wafer silikon dengan sifat pemantul (reflektif). Jika antigen bereaksi dengan antibodi spesifik pada wafer, terjadi perubahan pada lapisan permukaan, yang menyebabkan perubahan pantulan cahaya.

Prosedur tipikal untuk uji aglutinasi lateks atau koaglutinasi

1. *Untuk antigen yang terikat sel:* gunakan sengkeli steril untuk memindahkan koloni yang terpisah dengan baik ke satu tetes larutan saline pada kaca objek dan campur secara hati-hati untuk mendapatkan emulsi yang agak keruh. Jika emulsi dalam larutan saline tersebut menunjukkan penggumpalan, hal itu biasanya menunjukkan galur kasar (*rough/R*) dan bukan galur halus (*smooth/S*), dan sel-sel tidak akan beraglutinasi dengan antibodi. Jika tidak tampak penggumpalan, tambahkan reagen dan lanjutkan dari langkah no 4.
Untuk antigen yang diekstraksi: Gunakan sengkeli steril untuk memindahkan koloni yang terpisah baik ke dalam tabung reaksi kecil yang berisi larutan pengestrak dan emulsikan. Inkubasi emulsi pada suhu 35° C atau sesuai petunjuk pabrik pembuat.
Untuk spesimen klinis (LCS, urin): panaskan spesimen sampai titik didih atau sesuai petunjuk pabrik pembuat. Dinginkan dan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 g selama 5–10 menit.
2. Tempatkan 1 tetes partikel berlapis antibodi pada kaca objek.
3. Tempatkan 1 tetes suspensi antigen di samping partikel berlapis antibodi.
4. Campur kedua tetesan pada kaca objek tersebut dan sebarkan dalam bentuk persegi.
5. Putar kaca objek menggunakan tangan dengan gerak memutar yang konstan selama 1 menit. Hati-hati jangan sampai campuran tumpah melewati batasan persegi tersebut.
6. Periksa kaca objek secara makroskopik untuk melihat adanya aglutinasi setelah waktu yang ditetapkan sesuai petunjuk pabrik pembuat. Untuk penglihatan terbaik, pegang kaca objek di dekat cahaya terang dan amati pada latar belakang gelap.
7. Hasil positif dicatat bila antigen yang dicampur antibodi menunjukkan aglutinasi, yaitu suspensi menunjukkan penggumpalan atau berbutir sampai seperti bubur. Aglutinasi paling mudah dilihat dengan cara memiringkan kaca objek sedikit sehingga cairan mengalir ke batas bawah persegi tersebut.

BAGIAN II

Media dan reagen yang esensial

Pendahuluan

Hanya dengan sedikit materi diagnostik, suatu laboratorium dapat memberikan sumbangsih yang penting bagi perawatan pasien per individu melalui diagnosis etiologis yang akurat. Di sebagian besar negara berkembang, praktek laboratorium bakteriologis terhambat oleh kurangnya media biakan dan reagen dasar yang sangat mahal untuk diimpor. Walaupun demikian, jumlah media biakan dan reagen yang harus dibeli dapat dikurangi menjadi yang esensial saja, melalui pemilihan yang rasional, selayaknya daftar obat esensial. Selain itu, beberapa media dan reagen sederhana dapat diproduksi atau dibuat secara lokal. Penerapan kedua pendekatan ini akan sangat mengurangi kebutuhan terhadap mata uang luar dan menjadikan bahan laboratorium yang diperlukan untuk perawatan pasien dan studi epidemiologis lebih mudah diperoleh.

Bab ini dibuat untuk memungkinkan manager laboratorium kesehatan memusatkan sumber dayanya pada media dan reagen yang paling relevan. Bab ini terbagi atas dua bagian yang keduanya terdiri dari serangkaian daftar.

Patogen, media, dan reagen diagnostik

Patogen yang diperkirakan

Patogen didaftar menurut sejumlah faktor:

- kekerapan isolasi
- relevansi klinis
- beratnya penyakit
- potensi epidemi
- rasio untung-rugi untuk isolasi dan/atau identifikasi

Daftar tersebut sama sekali tidak mutlak dan akan bervariasi antarnegara atau antarlaboratorium, tergantung pada pola penyakit lokal, kapasitas laboratorium dan sumber daya yang tersedia.

Derajat prioritas media dan reagen diagnostik

Batasan tertentu fleksibilitas telah tercakup melalui penerapan derajat prioritas untuk media dan reagen diagnostik sebagaimana berikut:

Derajat 1: Prioritas tinggi

Derajat 2: Prioritas sedang

Derajat 3: Prioritas rendah

Media dan reagen diagnostik diurutkan menurut prioritas sesuai daftar patogen yang diisolasi dan diidentifikasi dengan media dan reagen tersebut. Walaupun demikian, mungkin terdapat perbedaan. Jika media digunakan secara luas untuk lebih dari satu patogen, media ini dapat mempunyai skor yang lebih tinggi dibandingkan setiap media yang digunakan untuk satu patogen saja.

Derajat 1: Media dan reagen diagnostik prioritas tinggi harus tersedia di semua laboratorium yang menjalankan praktek umum diagnostik bakteriologi. Media dan reagen ini paling sering dipakai untuk penggunaan umum, mudah dibuat, dan jumlahnya sedikit.

Derajat 2: Media dan reagen diagnostik prioritas sedang adalah bahan-bahan tambahan, yang menjadikan diagnosis laboratorium lebih lengkap dan lebih berguna dalam studi epidemiologis, walaupun mungkin tidak esensial untuk perawatan pasien secara langsung, misalnya antiserum untuk penetapan grup meningokokus.

Derajat 3: Media dan reagen diagnostik prioritas rendah adalah bahan-bahan yang kadang-kadang saja bermanfaat untuk penanganan pasien, tetapi berguna dalam pengajaran, penelitian, dan pemeriksaan khusus oleh laboratorium rujukan. Kategori ini mengacu pada media dan reagen diagnostik yang terlalu mahal untuk pemakaian umum, atau yang diperlukan untuk isolasi dan identifikasi organisme yang jarang ditemukan atau sulit diisolasi sehingga sering kali harganya tidak murah.

Berikut ini merupakan daftar patogen, disertai media dan reagen diagnostik yang diperlukan, dan dilengkapi dengan derajat prioritas yang dianjurkan untuk pemeriksaan laboratorium umum. Derajat prioritas harus disesuaikan untuk tiap laboratorium menurut keadaan setempat.

Darah

Patogen yang diperkirakan

Bacteroides fragilis
Brucella
Burkholderia pseudomallei
Candida albicans dan *Cryptococcus neoformans*
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
 Kuman non fermenter selain *Pseudomonas aeruginosa*
 Enterobacteriaceae lain
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella typhi dan *non-typhi*
Staphylococcus aureus
Streptokokus (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus viridans*)

Media dan reagen diagnostik

Kaldu biakan darah

Derajat prioritas

Tryptic soy broth (TSB) dapat diganti dengan kaldu kaya lain, misalnya, *brain-heart infusion broth*, bisa ditambah dengan sodium polianetol sulfonat (SPS) 0,25 g/l 1
 Kaldu biakan darah "anaerobik": kaldu tioglikolat atau kaldu Schaedler atau kaldu anaerob Wilkens-Chalgren 2

Media isolasi

Subkultur pada agar darah, agar coklat, dan agar MacConkey 1

Reagen diagnostik

Cakram basitrasin 1
 Plasma koagulase 1
 Reagen uji β -laktamase 1
 Cakram optochin 1
 Reagen oksidase 1
 Antiserum aglutinasi *Salmonella* 1
 Faktor V dan XV 2
 Antiserum *Haemophilus influenzae* tipe b 3
 Serum aglutinasi *Neisseria meningitidis* (polivalen dan grup spesifik A, B, C) 3

Cairan serebrospinal

Patogen yang diperkirakan

Cryptococcus neoformans
 Enterobacteriaceae
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Mycobacterium tuberculosis
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae

Media dan reagen diagnostik

Media isolasi

	Derajat prioritas
Agar darah (dengan guratan <i>Staphylococcus</i>)	1
Agar coklat	1
Agar MacConkey	1
Media Löwenstein-Jensen	2
Agar dekstrosa Sabouraud	2

Reagen diagnostik

Tinta India	1
Reagen uji β -laktamase	1
Cakram optochin	1
Reagen oksidase	1
Faktor V dan XV	2
Antiserum <i>Haemophilus influenzae</i> tipe b	3
Serum aglutinasi <i>Neisseria meningitidis</i> (polivalen dan grup spesifik A, B, C)	3

Uji diagnostik cepat

Perangkat uji untuk diagnosis cepat bakteri penyebab meningitis	3
---	---

Urine

Patogen yang diperkirakan

Candida albicans
 Enterokokus
Eschericia coli
Mycobacterium tuberculosis
 Enterobacteriaceae lain
 Staphylococcus lain
Pseudomonas dan bakteri non-fermenter lain
Staphylococcus saprophyticus

Media dan reagen diagnostik

Media isolasi dan kuantitatif

	Derajat prioritas
Agar darah	1
Agar brolacin (dapat diganti dengan agar laktosa ungu, agar MacConkey, agar tanpa kristal violet, atau agar <i>eosin methylene-blue</i>)	1
Agar CLED	1

Media identifikasi dan reagen diagnostik

Tablet β -glukuronidase (PGUA) untuk identifikasi <i>E. coli</i>	1
Untuk batang Gram negatif:	
<i>Kligler iron agar</i> (KIA)	1
reagen Kovacs untuk indol	1
media motilitas-indol-urease (MIU)	1

reagen oksidase	1
kaldu dekarboksilase lisin (Möller)	2
uji ONPG	2
agar Simmons sitrat	2
Untuk stafilokokus dan enterokokus:	
uji katalase (H_2O_2)	1
plasma koagulase	1
agar bile-aesculin (untuk enterokokus)	2
cakram novobiocin (5 µg) untuk membedakan stafilokokus koagulase-negatif	3

Tinja

Patogen yang diperkirakan

Aeromonas dan *Plesiomonas*

Campylobacter spp.

Eschericia coli (enteropatogenik, enterotoksigenik, enteroinvasif dan enterohemoragik)

Salmonella spp. non tifoid dan *Edwardsiella*

Salmonella typhi dan *S. paratyphi*

Shigella

Vibrio cholerae serogrup O1, vibrio non-kolera

Yersinia enterocolitica

Media dan reagen diagnostik

Media transpor

	<i>Derajat prioritas</i>
Media Cary-Blair (untuk semua patogen)	1
Larutan saline gliserol berdapar (tidak untuk <i>Vibrio</i> atau <i>Campylobacter</i>)	2

Media pengayaan (*enrichment*)

Kaldu Selenit F	1
Air pepton alkali	2

Media isolasi

Agar deoksikolat-sitrat (dapat diganti dengan agar <i>Salmonella-Shigella</i> , agar xilosa-lisin-deoksikolat (XLD)	1
Agar MacConkey (dengan kristal violet)	1
Agar TCBS	1
Media <i>Campylobacter</i> : Agar basa Columbia atau semua agar basa darah dengan darah yang dilisiskan dan suplemen antibiotik, atau media yang berdasar arang (charcoal)	2

Media dan reagen diagnostik tahap awal

<i>Kligler iron agar</i> (KIA) (dapat diganti dengan <i>triple sugar iron agar</i> (TSI), tetapi hanya untuk patogen enterik)	1
Reagen Kovacs untuk indol	1
Media motilitas-indol-urease (MIU) (dapat diganti dengan media uji motilitas + kaldu pepton urea)	1
Reagen oksidase	1

Media dan reagen diagnostik spesifik

Air pepton Andrade (atau kaldu dasar merah fenol)	2
Kaldu lisin dekarboksilase (Möller)	2
Uji ONPG	2
Agar Simmons sitrat	2
Cakram senyawa Vibriostatik O:129	2

Antiserum aglutinasi

		Derajat prioritas
<i>Salmonella</i> :	antiserum polivalen O (A-I dan Vi)	1
	antiserum faktor O: O:2 (A), O:4 (B), O:9 (D), Vi	2
	antiserum faktor H: H:a, H:b, H:d, H:i, H:m, H:2	3
	antiserum H pembalik-fase: H:b, H:i, H:1,2	3
<i>Shigella</i> :	<i>dysenteriae</i> polivalen, <i>flexneri</i> polivalen, <i>boydii</i>	
	polivalen, <i>sonnei</i> polivalen	1
	<i>dysenteriae</i> tipe 1 (Shiga)	1
<i>Vibrio cholerae</i> :	antiserum O1 polivalen	1
	subtipe B (Ogawa), C (Inaba), O:139	3
<i>Haemophilus influenzae</i> :	tipe b	3
<i>Neisseria meningitidis</i> :	polivalen	3
	faktor tunggal A, B, C	3

Saluran napas atas

Patogen yang diperkirakan

Candida albicans (orofaring)
Corynebacterium diphtheriae (tenggorok dan hidung)
Haemophilus influenzae (telinga dan sinus)
Moraxella catarrhalis (telinga dan sinus)
Neisseria meningitidis
Pseudomonas
Staphylococcus aureus (telinga dan sinus)
Streptococcus pneumoniae (telinga dan sinus)
Streptococcus pyogenes (grup A, tenggorok)

Media dan reagen diagnostik

Media isolasi

	Derajat prioritas
Agar darah (dibuat dari agar basa bebas-glukosa)	1
Agar coklat	2
Serum terkoagulasi Löffler atau media telur Dorset	2
Agar darah telurit	2
Media modifikasi Thayer-Martin (untuk gonokokus dan meningokokus)	3

Reagen diagnostik

Cakram basitrasin	1
Reagen katalase dan koagulase	1
Cakram optochin	1
Media degradasi karbohidrat untuk <i>Neisseria</i> spp.	2

Reagen oksidase	2
Faktor V dan XV (cakram atau carik)	2
Tributirin	3

Uji diagnostik cepat

Perangkat penentuan grup untuk <i>Streptococcus hemolyticus</i>	3
---	---

Saluran napas bawah

Patogen yang diperkirakan

Candida albicans
Enterobacteriaceae
Haemophilus influenzae
Klebsiella pneumoniae
Moraxella catarrhalis
Mycobacterium tuberculosis
Staphylococcus aureus
Streptococcus pneumoniae

Media dan reagen diagnostik

Media isolasi

	Derajat prioritas
Agar darah	1
Agar coklat	1
Agar MacConkey	1
Media Löwenstein-Jensen	2
Agar dekstroza Sabouraud	3
Agar darah selektif untuk <i>Haemophilus</i> (basitrasin atau vankomisin)	3

Reagen diagnostik

Plasma koagulase	1
Cakram optochin	1
Reagen oksidase	2
Faktor V dan XV (cakram atau carik)	2
Tributirin	3

Spesimen urogenital untuk eksklusi penyakit menular seksual (PMS)

Patogen yang diperkirakan

Candida albicans (pemeriksaan mikroskopik)
Chlamydia trachomatis
Gardnerella vaginalis (pemeriksaan mikroskopik)¹
Haemophilus ducreyi
Neisseria gonorrhoeae
Treponema pallidum (mikroskop lapangan gelap)

¹ *Gardnerella vaginalis* adalah suatu organisme indikator untuk vaginosis, tetapi bukan suatu patogen

Media dan reagen diagnostik

Media transpor

Media transpor Amies atau media transpor Stuart

Derajat prioritas

1

Media isolasi

Media modifikasi Thayer-Martin (MTM) atau media *New York City* (NYC)

1

Agar darah-kuda coklat Mueller-Hinton + vankomisin + IsoVitalEX untuk

Haemophilus ducreyi

3

Reagen identifikasi

Uji nitrocefin atau reagen uji β -laktamase lain

1

Reagen oksidase

1

Pus dan eksudat

Patogen yang diperkirakan

Bacillus anthracis

Bacteroides dan anaerob obligat lain

Clostridium perfringens

Enterobacteriaceae

Mycobacterium tuberculosis, *M. ulcerans*

Mycobacterium spp. lain

Pasteurella multocida

Pseudomonas dan organisme non-fermenter lain

Staphylococcus aureus

Streptococcus pyogenes

Streptococcus (spesies lain)

Media dan reagen diagnostik

Media isolasi

Agar darah

1

Agar MacConkey

1

Agar garam manitol

2

Kaldu tioglikolat (dengan indikator) (dapat diganti dengan media daging

masak, kaldu Schaedler, kaldu Wilkins-Chalgren)

2

Tryptic soy broth (TSB)

2

Reagen diagnostik

Uji katalase (H_2O_2)

1

Plasma koagulase

1

Reagen oksidase

1

Generator hidrogen untuk stoples anaerob

2

Daftar media dan reagen diagnostik yang dianjurkan untuk laboratorium mikrobiologi tingkat menengah

Media biakan

Media yang dianjurkan	Alternatif	Derajat prioritas
Agar bile-aesculin		1
Agar darah (lihat <i>tryptic soy agar</i>)		1
Agar brolacin	Agar laktosa ungu, agar CLED	1
<i>Kligler iron agar</i> (KIA)		1
Serum terkoagulasi Löffler	Media telur Dorset	1
Media Löwenstein-Jensen		1
Agar MacConkey (dengan kristal violet)	agar eosin metilen-biru	1
Agar MacConkey (tanpa kristal violet)		1
Media motilitas-indol-urease (MIU)	media uji motilitas + kaldu urea + air pepton (tripton)	1
Agar Mueller-Hinton		1
Agar dekstrosa Sabouraud		1
Agar deoksikolat sitrat	Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	1
<i>Tryptic soy agar</i> (TSA)	Agar Columbia	1
<i>Tryptic soy broth</i> (TSB)	kaldu <i>brain-heart infusion</i>	1
TCBS		1
Media transpor (Amies)	Media transpor (Stuart atau Cary-Blair)	1
Air pepton Andrade	kaldu fenol merah	2
Kaldu dekarboksilase (Möller)		2
<i>Mannitol salt agar</i> (MSA)		2
Kaldu Selenit F		2
Agar Simmons sitrat		2
Media tioglikolat (dengan indikator)	Kaldu Schaedler, kaldu anaerob Wilkens-Chatgren, media daging masak	2
Agar DNase		3

Inhibitor atau antimikroba yang digunakan dalam media atau sebagai reagen

Kloramfenikol (untuk isolasi jamur)	1
Suplemen antimikroba gonokokus: vankomisin, kolistin, nistatin (trimetoprim): VCN (VCNT)	1
Suplemen antimikroba <i>Campylobacter</i>	2
Larutan telurit (untuk isolasi <i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	2
Basitrasin (untuk isolasi <i>Haemophilus</i> spp.)	3
Vankomisin (untuk isolasi <i>Haemophilus ducreyi</i> atau <i>H. influenzae</i>)	3

Pengayaan (*Enrichment*) untuk media biakan

IsoVitaleX (Polyvitex, Vitox, suplemen B, suplemen VX, suplemen CVA)	2
Sodium polianetol sulfonat (SPS)	3

Cakram, tablet, atau carik diagnostik

Cakram basitrasin	1
Cakram atau reagen nitrocefin (Cefinase)	1
Uji ONPG	1
Cakram optochin	1
Reagen oksidase	1
PGUA (β -glukuronidase)	1
Faktor V dan XV	2
Cakram novobiocin (5 μ g)	3
Uji PYR	3
Tributirin	3
Cakram senyawa vibriostatik O:129	3

Perangkat diagnostik

Perangkat serodiagnostik cepat untuk identifikasi bakteri penyebab meningitis	3
Perangkat penentuan grup serologis untuk streptokokus hemolitik	3

Reagen diagnostik lainnya

Barium sulfat standar (untuk metode Kirby-Bauer)	1
Reagen pulasan Gram	1
Hidrogen peroksida (H_2O_2) (katalase)	1
Reagen Kovacs (untuk indol)	1
Reagen oksidase (dimetil-p-fenilendiamin)	1
Plasma (untuk uji koagulase dan uji <i>germ-tube</i>)	1
Pulasan Ziehl-Neelsen	1
Larutan garam gliserol berdapar (untuk pengiriman tinja)	2
Karbohidrat: glukosa, laktosa, maltosa, manitol, sukrosa	2
Generator hidrogen untuk stoples anaerob	2
Tinta India (untuk deteksi kapsul)	2
Lisin (untuk uji dekarboksilase)	2

Cakram uji kepekaan

Antimikroba yang termasuk dalam daftar obat esensial WHO (2002)

amoksisilin
ampisilin
bensilpenisilin
kloramfenikol
siprofloksasin
kotrimoksazol (sulfametoksazol-trimetoprim)
kloksasilin
eritromisin
gentamisin

kanamisin
asam nalidiksat
nitrofurantoin
sulfonamida
tetrasiklin (atau doksisisiklin)
trimetoprim

Antimikroba cadangan

amoksi-klav
amikasin
sefalotin
sefazolin
sefotaksim
seftazidim
seftriakson
sefuroksim
siprofloksasin atau fluorokuinolon lain
klindamisin
piperasilin
vankomisin

Antiserum aglutinasi

		Derajat prioritas
<i>Salmonella</i> :	antiserum polivalen O (A-I dan Vi)	1
	antiserum faktor O: O:2 (A), O:4 (B), O:9 (D), Vi	2
	antiserum faktor H: H:a, H:b, H:d, H:i, H:m, H:2	3
	antiserum H pembalik fase: H:b, H:i, H:1,2	3
<i>Shigella</i> :	<i>dysenteriae</i> polivalen, <i>flexneri</i> polivalen, <i>boydii</i>	1
	polivalen, <i>sonnei</i> polivalen	
	<i>dysenteriae</i> tipe 1 (Shiga)	1
<i>Vibrio cholerae</i> :	antiserum O1 polivalen	1
	subtipe B (Ogawa), C (Inaba), O:139	3
<i>Haemophilus influenzae</i> :	tipe b	3
<i>Neisseria meningitidis</i> :	polivalen	3
	faktor tunggal A, B, C	3

Bacaan lanjutan terpilih

- August MJ et al. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. *Cumitech*, 1990, 3A:1-14.
- Basics of quality assurance for intermediate and peripheral laboratories, 2nd ed. Alexandria, WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2000.
- Baron EJ, Finegold SM. *Diagnostic microbiology*, 8th ed. St Louis, MO, The C.V. Mosby Company, 1990.
- Blazevic DJ et al. Practical quality control procedures for the clinical microbiology laboratory. *Cumitech*, 1976, 3:1-12.
- Cheesbrough M. *Medical laboratory manual for tropical countries. Vol II: Microbiology*. London, Tropical Health Technology/ Butterworths, 1989.
- Collins CH, Lyne PM. *Microbiological methods*, 5th ed. London, Butterworths, 1985.
- Gillies RP, Paul J. *Bacteriology illustrated*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1983.
- Howard BJ et al. *Clinical and pathogenic microbiology*. St Louis, MO, The C.V. Mosby Company, 1987.
- Koneman EW. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed. Philadelphia, Lippincott, 1997.
- Miller JM. *Quality control in microbiology*. Atlanta, GA, Centers for Disease Control and Prevention, 1987.
- Miller JM, Wentworth BB. *Methods for quality control in diagnostic microbiology*. Washington, DC, American Public Health Association, 1985.
- Montefiore DG et al. *Tropical microbiology*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1984.
- Murray P et al. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 2003.
- Stokes EJ et al. Quality control. In: *Clinical bacteriology*, 7th ed. London, Edward Arnold, 1993.
- Turk DC et al. *A short textbook of medical microbiology*. London, Hodder & Stoughton, 1983.
- Summanen P et al. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. Belmont, CA, Star Publishing Company, 1993.

FORMULIR PEMESANAN

Yang terhormat

Bagian Pemasaran

Penerbit Buku Kedokteran EGC

Jl. Agung Timur 4 Blok O1 No. 39

Sunter Agung Podomoro, Jakarta 14350

Telepon (021) 6530 6283, 6530 6712 • Fax. (021) 651 8178

....., 20

Mohon dikirimkan: ☐ Informasi buku baru

☐ Daftar harga/katalog

Untuk buku: ☐ Kedokteran Umum

☐ Kedokteran Gigi

☐ Keperawatan

☐ Arcan

☐ FKM

☐ Farmasi

Kami pun memesan buku berjudul

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Pembayaran sebesar Rp telah kami kirimkan melalui

☐ Wesel pos, d/a CV EGC

Jl. Agung Timur 4 Blok O1 No. 39

Sunter Agung Podomoro,

Jakarta 14350

Formulir ini dapat diperbanyak dengan fotokopi

