

**TESIS**

**EVALUASI MEDIA KROMOGENIK DALAM ISOLASI DAN IDENTIFIKASI  
LANGSUNG *ESCHERICHIA COLI* PENYEBAB INFEKSI SALURAN  
KEMIH PADA WANITA HAMIL**

***EVALUATION OF CHROMOGENIC MEDIA IN ISOLATION AND  
DIRECT IDENTIFICATION OF ESCHERICHIA COLI CAUSES URINARY  
TRACT INFECTIONS IN PREGNANT WOMEN***

**DHIAN KARINA APRILANI HATTAH**

**P062192028**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS**

**EVALUASI MEDIA KROMOGENIK DALAM ISOLASI DAN IDENTIFIKASI LANGSUNG *ESCHERICHIA COLI* PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH PADA WANITA HAMIL**

Disusun dan diajukan oleh :


**DHIAN KARINA APRILANI HATTAH**  
Nomor Pokok P062192028


Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Pada tanggal 21 Juni 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,


Pembimbing Pendamping,

  
dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D., Sp.MK  
NIP: 19690918 199603 2 001

  
Dr. dr. Sriwijaya, Sp. OG(K)  
NIP: 19681225 200012 2 005

Ketua Program Studi  
Ilmu Biomedik

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

  
Dr. dr. Ika Yustisia, MSc  
NIP: 19970121 200312 2 003

  
  
Prof. Dr. Hamka, M.A.  
NIP: 19611104 198702 1 001

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dhian Karina Aprilani Hattah

Nomor pokok : P062192028

Program Studi : Ilmu Biomedik

Konsentrasi : Mikrobiologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 21 Juni 2022

Yang menyatakan,



Dhian Karina Aprilani Hattah

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah Puji Syukur senantiasa penulis panjatkan kehadiran **Allah Subhanahu wa ta'ala** atas segala berkah, rahmat, hidayah, dan nikmat-Nya, serta salam dan salawat tercurah kepada junjungan **Nabiullah Muhammad Shallahu 'alaihi wasalam** sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Pendidikan sebagai Magister.

Pertama-tama saya haturkan ucapan terima kasih yang tulus kepada orang tua saya, **Ayahanda Prof. Dr. Ir. Muhammad Hattah Fattah, MS** dan **Ibunda Dr. Ir. St. Rahbiah Busaeri, MSi** yang memelihara, menjaga, membesarkan, dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang serta menanamkan nilai-nilai kehidupan dalam diri saya sehingga saya mampu menjadi insan seperti saat ini.

Penyusunan dan penyelesaian tesis ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga penulis dengan rasa syukur menyampaikan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada : **dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., PhD., Sp.MK** selaku Pembimbing 1 dan **Dr. dr. Sriwijaya, Sp.OG(K)** selaku pembimbing 2, serta **Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes., Dr. dr. Yuyun Widaningsih, M.Kes., Sp.PK(K)**, dan **Dr. Rosana Agus, M.Si** selaku penguji, yang telah memberikan bimbingan dan ilmunya dengan ikhlas sehingga tesis ini dapat saya selasaikan dengan baik.

Rasa hormat dan terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Hasanuddin **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.**, Direktur Sekolah Pasca Sarja **Prof. Dr. Hamka, M.A.**, Ketua Program Studi S2 Ilmu Biomedik **Dr. dr. Ika Yustisia, M Sc**, yang telah memberikan bimbingan dan ilmunya dengan ikhlas sehingga tesis ini dapat saya selasai dengan baik.

Rasa terima kasih saya sampaikan kepada suami saya **Laode Muhammad Asfan Mujahid, ST., MT.**, dan **Nurul Rezky, Ian Astarina Mas'ud, Husnul Inayah, Sitti Rahmah Mustakin, Wa Ode Siti Purnamasari**, selaku teman seangkatan saya di program studi mikrobiologi yang telah membantu dan mendorong saya untuk terus berusaha dalam menyelesaikan tesis ini demi mewujudkan cita-cita untuk memperoleh gelar M.Biomed.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat saya tuliskan satu persatu, penulis sampaikan rasa terima kasih. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini.

Makassar, 21 Juni 2022

Dhian Karina Aprilani Hattah

## ABSTRAK

**DHIAN KARINA APRILANI HATTAH.** *Evaluasi Media Kromogenik dalam Isolasi dan Identifikasi Langsung Escherichia coli Penyebab Infeksi Saluran Kemih pada Wanita Hamil (dibimbing oleh Rizalinda Sjahril dan Sriwijaya).*

Media konvensional seperti media MacConkey (MAC) masih digunakan untuk mengisolasi patogen Infeksi saluran kemih (ISK) pada sebagian besar negara berkembang. Media konvensional belum mampu mengidentifikasi patogen saluran kemih secara langsung sehingga memerlukan pemeriksaan biokimia tambahan serta penambahan waktu dan biaya. Media kromogenik dibutuhkan sebagai media generasi baru dalam identifikasi langsung organisme, khususnya *Escherichia coli (E.coli)*, sebagai salah satu patogen terbanyak pada ISK wanita hamil.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi media kromogenik dalam isolasi dan identifikasi langsung *E.coli* penyebab ISK pada wanita hamil. Sampel penelitian yang digunakan adalah 48 isolat *E.coli* dari kultur urin wanita hamil. Teknik sampling yang digunakan adalah *consecutive sampling*. Data yang dikumpulkan dianalisis untuk menentukan nilai sensitivitas, spesifisitas, *Positive Predictive Value (PPV)*, *Negative Predictive Value (NPV)* dan dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney untuk melihat perbedaan pertumbuhan koloni pada media kromogenik dan MAC.

Hasil penelitian menunjukkan nilai sensitivitas, spesifisitas, PPV, NPV dalam mengidentifikasi *E.coli* pada ISK wanita hamil pada media kromogenik yaitu 91.8%, 94.7%, 97.1%, 85.7% sedangkan pada MAC yaitu 83.3%, 85%, 90.9%, 73.9%. Berdasarkan perbandingan waktu inkubasi, kedua media mulai pada 12 jam. Penampakan secara visual morfologi *E.coli* pada media kromogenik lebih baik dibandingkan dengan MAC. Dari segi perhitungan jumlah koloni yang tumbuh, media kromogenik secara signifikan lebih banyak dibandingkan media MAC. Adapun biaya per *plate* media MAC sebesar Rp 5.792 dan media kromogenik sebesar Rp 5.829. Sebagai kesimpulan, media kromogenik dapat digunakan sebagai media kultur urin primer dalam isolasi dan identifikasi langsung *E.coli* penyebab ISK.

Kata kunci: *media kromogenik, identifikasi langsung, Escherichia coli, infeksi saluran kemih, wanita hamil*



## ABSTRACT

**DHIAN KARINA APRILANI HATTAH.** *Evaluation of Chromogenic Media in Isolation and Direct Identification of Escherichia coli Causes Urinary Tract Infections in Pregnant Women* (supervised by **Rizalinda Sjahril** and **Sriwijaya**).

Conventional media such as MacConkey media (MAC) are still used for isolating Urinary tract infection (UTI) pathogens in most developing countries. Conventional media have not been able to identify urinary tract pathogens directly, requiring additional biochemical examinations and additional time and cost. Chromogenic media is needed as a new generation medium for direct identification of organisms, particularly *Escherichia coli* (*E.coli*), as one of the most pathogens in pregnant women's UTIs.

The study aims to evaluate chromogenic media in isolation and direct identification of *E.coli* causing UTIs in pregnant women. The study samples were 48 *E.coli* isolates from a pregnant woman's urine culture. The sampling technique used is consecutive sampling. The data collected were analyzed to determine the values of sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV) and analyzed using the Mann-Whitney test to see differences in colony growth chromogenic and MAC.

The results showed that the sensitivity, specificity, PPV, NPV in identifying *E.coli* UTIs of pregnant women in chromogenic media were 91.8%, 94.7%, 97.1%, 85.7%, while on MAC were 83.3%, 85%, 90.9%, 73.9%. Based on the comparison of incubation time, both media started at 12 hours. Visually morphological appearance of *E.coli* in chromogenic media is better than in MAC. In calculating the number of colonies that grow, chromogenic media is significantly more than MAC. The cost per plate of MAC was Rp 5.792, and chromogenic media was Rp 5.829. In conclusion, chromogenic media can be used as a primary urine culture medium for isolation and direct identification of *E.coli* causing UTIs.

**Keywords:** *chromogenic media, direct identification, Escherichia coli, urinary tract infections, pregnant women.*



## DAFTAR ISI

Sampul dalam .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tesis .....	iii
Kata Pengantar .....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Tabel .....	x
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Singkatan .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.2 Infeksi Saluran Kemih .....	9
2.2.1 Definisi .....	9
2.2.2 Klasifikasi .....	10
2.2.3 Epidemiologi.....	12
2.2.4 Etiologi .....	12
2.2.5 Faktor Risiko .....	13
2.2.6 Patogenesis .....	15
2.2.7 Manifestasi Klinis .....	18
2.2.8 Kriteria Diagnosis .....	19
2.3 Pemeriksaan Dipstik Urin .....	19
2.4 Pewarnaan Gram .....	21
2.5 Identifikasi Bakteri Metode Kultur Urin .....	22
2.5.1 Metode Kultur Urin Media Konvensional.....	22
2.5.2 Metode Kultur Urin Media Kromogenik .....	28
2.6 Tes Biokimia.....	36
2.6.1 Tes Biokimia Metode Konvensional .....	36
2.6.2 Tes Biokimia Metode VITEK 2 .....	42
2.6.3 Tes Biokimia Metode Analytical Profile Index (API) .....	49
2.7 Kerangka Teori.....	62
2.8 Kerangka Konsep.....	63
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>64</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	64
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian .....	65
3.4 Alat dan Bahan.....	66
3.5 Prosedur Penelitian .....	67
3.6 Alur Penelitian .....	75
3.7 Definisi Operasional Variabel.....	75



3.8 Analisis Statistik .....	77
3.9 Etika Penelitian .....	78
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>80</b>
4.1 Hasil Penjaminan Mutu Pemeriksaan .....	80
4.2 Hasil Penelitian .....	82
1. Distribusi Data Pasien Berdasarkan Usia .....	82
2. Distribusi Data Pasien Berdasarkan Usia Kehamilan .....	83
3. Distribusi Data Pasien Berdasarkan Riwayat Kehamilan .....	83
4. Hasil Identifikasi pada Media MacConkey .....	84
5. Hasil Identifikasi pada Media Kromogenik .....	84
6. Sensitivitas, Spesifisitas, PPV (positive predictive value), NPV (negative predictive value) Media MacConkey dan Kromogenik dalam Identifikasi Escherichia coli .....	85
7. Perbandingan Waktu Inkubasi, morfologi, dan jumlah koloni antara Media MacConkey dan Kromogenik dalam Kultur Isolat Escherichia coli .....	86
8. Perbandingan Biaya Media MacConkey dan Kromogenik .....	87
4.3 Pembahasan .....	88
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>96</b>
5.1 Kesimpulan .....	96
5.2 Saran .....	99
DAFTAR PUSTAKA.....	98
LAMPIRAN .....	104

## DAFTAR TABEL

2.1. Klasifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.2. Perubahan saluran kemih pada kehamilan .....	14
2.3. Manifestasi Klinis pada ISK... ..	18
2.4. Komposisi Media <i>Blood Agar</i> .....	24
2.5. Komposisi Media MacConkey .....	28
2.6. Komposisi media kromogenik .....	30
2.7. Reaksi enzim dan warna koloni pada kromogenik (Biomerieux)...	32
2.8. Reaksi enzim dan warna koloni pada media kromogenik (Merck).33	
2.9. Reaksi Indol dalam identifikasi <i>Proteeae sp</i> .....	33
2.10. Uji biokimia pada kartu GN VITEK 2.....	46
2.11. Uji biokimia pada kartu GP VITEK 2 .....	47
2.12. Jenis pemeriksaan metode API.....	50
2.13. Tes biokimia pada API Staph.....	53
2.14. Tes biokimia pada API 20 Strep.....	56
2.15. Tes biokimia pada API 20 E .....	59
2.16. Tes biokimia pada API 20 NE .....	61
3.1. Kriteria objektif leukosit esterase dengan dipstik urin .....	68
3.2. Kriteria objektif isolasi dan identifikasi mikroorganism dengan media BA dan MacConkey .....	69
3.3. Kriteria objektif isolasi dan identifikasi mikroorganism dengan media kromogenik <i>E.coli</i> .....	70
3.4. Kriteria objektif pewarnaan gram .....	71
3.5. Kriteria Objektif Identifikasi <i>Escherichia coli</i> dengan metode Tes Biokimia IMViC (Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, Citrat), dan TSIA .....	73
3.6. Kriteria objektif morfologi dan perhitungan jumlah koloni <i>Escherichia coli</i> pada media macconkey dan kromogenik.....	74
3.7. Definisi Operasional.....	75
4.1. Penjaminan mutu alat dan bahan dalam penelitian.....	81
4.2. Distribusi data pasien berdasarkan usia .....	82
4.3. Distribusi data pasien berdasarkan usia kehamilan .....	83
4.4. Distribusi data pasien berdasarkan riwayat kehamilan.....	83
4.5. Hasil Identifikasi pada media MacConkey .....	84
4.6. Hasil identifikasi pada Media Kromogenik .....	84
4.7. Sensitivitas, Spesifisitas, PPV ( <i>positive predictive value</i> ), NPV ( <i>negative predictive value</i> ) Media MacConkey dalam Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	85
4.8. Sensitivitas, Spesifisitas, PPV ( <i>positive predictive value</i> ), NPV ( <i>negative predictive value</i> ) Media Kromogenik dalam Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	85
4.9. Perbandingan waktu inkubasi, morfologi, dan jumlah koloni media macconkey dan kromogenik dalam kultur isolat <i>Escherichia coli</i> .....	86
4.10. Perbandingan biaya media MacConkey dan Kromogenik.....	87

## DAFTAR GAMBAR

2.1. Beta hemolisis dari bakteri <i>Streptococcus sp</i> .....	24
2.2. Alfa hemolisis bakteri <i>Streptococcus sp.</i> (Kelompok Viridans) termasuk spesies seperti <i>Streptococcus mutans, mitis</i> .....	25
2.3. Alfa hemolisis <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	25
2.4. Gama hemolisis <i>Enterococcus faecalis</i> (24 jam non-hemolitik) ....	26
2.5. Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> pada agar MacConkey .....	28
2.6. Mekanisme enzimatik substrat kromogenik.....	31
2.7. Konsentrasi bakteri dalam sampel.....	33
2.8. <i>Escherichia coli</i> pada media kromogenik ISK (Biomerieux) .....	34
2.9. <i>Escherichia coli</i> pada media kromogenik ISK (Merck) .....	34
2.10. <i>Enterococci</i> pada media kromogenik ISK.....	34
2.11. <i>Proteus mirabilis</i> pada media kromogenik ISK.....	34
2.12. <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media kromogenik ISK .....	35
2.13. Interpretasi media kromogenik ISK.....	35
2.14. Kartu identifikasi kolorimetrik Gram negatif VITEK 2.....	43
2.15. Strip plastik API .....	51
2.16. Contoh lembar hasil API .....	51
2.17. Kerangka Teori .....	62
2.18. Kerangka Konsep .....	63
3.1. Alur Penelitian.....	75
4.1. Grafik perbandingan waktu inkubasi dan jumlah koloni antara medium macconkey dan kromogenik dalam kultur isolat <i>Escherichia coli</i> .....	87

## DAFTAR SINGKATAN

API	<i>Analytical Profile Index</i>
ASB	<i>Asymptomatic Bacteriuria</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	<i>Blood Agar</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
DM	<i>Diabetes Melitus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. hermannii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i>
F	<i>Fermenter</i>
FeS	<i>Ferosulfida</i>
FP	<i>Faktor Pengenceran</i>
GN	<i>Gram Negatif</i>
GP	<i>Gram Positif</i>
H <sub>2</sub> S	<i>Hidrogen Sulfida</i>
HUS	<i>Hemolytic Uremic Syndrome</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IMViC	<i>Indol, Methyl Red, Voges-Proskauer, Citrat</i>
ISK	<i>Infeksi Saluran Kemih</i>
KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter</i>
KOH	<i>Kalium Hidroksida</i>
LE	<i>Leukosit Esterase</i>
MAC	<i>MacConkey Agar</i>
mL	<i>Milliliter</i>
MR/VP	<i>Methyl Red/Voges-Proskauer</i>
NPV	<i>Negative Predictive Value</i>
ONPG	<i>Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside</i>
PIGR	<i>Polimer Immunoglobulin Receptor</i>
PPV	<i>Positive Predictive Value</i>
<i>Proteaeae</i>	<i>Proteus, Providencia, Morganella</i>
Rp	<i>Rupiah</i>
SIM	<i>Sulfur Indol Motility</i>
<i>sp.</i>	<i>Spesies</i>
TAP	<i>Tidak Ada Pertumbuhan</i>
TDA	<i>Triptofan deaminase</i>
TSIA	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
X-Gal	<i>6-chloro-3-Indoxyl-β-D-galactopyranoside</i>
X-Glu	<i>5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronic acid</i>
YST	<i>Yeast</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah infeksi yang umum terjadi di masyarakat baik di lingkungan komunitas maupun rumah sakit.<sup>1,2</sup> Hampir setengah populasi wanita dewasa mengalami setidaknya satu kali ISK (sistitis) selama hidup dan berisiko sekitar 25% mengalami ISK berulang dalam satu tahun berikutnya.<sup>3</sup> Insiden ISK pada wanita empat kali lebih tinggi dibandingkan pria dan salah satu faktor risikonya adalah kehamilan.<sup>3,4,5</sup> Perubahan anatomis dan fungsional saluran kemih dalam kehamilan menjadi penyebab adanya bakteri dalam urin (bakteriuria). Perubahan ini meningkatkan risiko komplikasi pada ibu dan bayi. Bakteriuria dalam kehamilan dikaitkan dengan peningkatan risiko komplikasi sebanyak 20 - 30% menjadi pielonefritis serta berhubungan dengan risiko *pre-eklampsia*, kelahiran prematur dan berat badan lahir rendah.<sup>5,6</sup>

Kant *et al*, 2017 melaporkan proporsi wanita hamil di India yang mengalami gejala ISK yaitu sebesar 33,3% dan terkonfirmasi 3,3% diantaranya.<sup>7</sup> Ramirez *et al*, 2019 menunjukkan prevalensi ISK pada wanita hamil di Columbia tahun 2013-2015 yaitu 29% dan dari kasus tersebut 54% adalah kasus sistitis dan 36% kasus pielonefritis.<sup>8</sup> Rosana *et al*, 2020 melaporkan bakteriuria asimtomatik dialami sebanyak 10,5% pada wanita

hamil di Jakarta.<sup>9</sup> Belum ada data tentang prevalensi ISK pada wanita hamil di Kota Makassar.

*Escherichia coli* merupakan spesies bakteri penyebab yang mendominasi pada hampir semua tipe ISK, disusul *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* sp.<sup>10</sup> Gebremariam *et al*, 2019 melaporkan patogen penyebab ISK terbanyak yaitu *E. coli* 48,6%, *Coagulase-negative Staphylococcus* 23%, *Staphylococcus aureus* 13,5%, dan *Klebsiella* sp. 8,1%.<sup>11</sup> Penelitian oleh Muhammad *et al*, 2020, Isolat *E. coli* teridentifikasi 68,9%, disusul *Klebsiella pneumoniae* 8,9%, dan *Staphylococcus aureus* 6,7%.<sup>12</sup>

Panduan *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) tahun 2019 merekomendasikan skrining dan pengobatan bakteriuria pada wanita hamil dan menyarankan pemeriksaan kultur urin pada kunjungan awal pemeriksaan kehamilan. Studi tahun 1960-1980 melaporkan pengobatan antimikroba dapat menurunkan angka kejadian pielonefritis dari 35% menjadi 1%-4% dan penurunan angka berat badan lahir rendah serta persalinan prematur. Pemberian antimikroba sesuai pemeriksaan kultur bakteri penyebab ISK akan menurunkan resistensi antibiotik.<sup>13</sup>

Metode diagnosis *gold standard* untuk menentukan etiologi ISK adalah kultur urin. Media kultur urin yang ideal harus mampu mendukung pertumbuhan patogen saluran kemih dan menghambat kontaminasi. Pada sebagian besar laboratorium di negara berkembang masih menggunakan

media konvensional seperti *Blood Agar* (BA) dan *Agar MacConkey* (MAC) bersama-sama/kombinasi dalam mengisolasi patogen saluran kemih. Namun, media konvensional tersebut belum mampu mengidentifikasi patogen saluran kemih secara langsung. BA mampu mendukung pertumbuhan mayoritas bakteri penyebab ISK karena kandungan mediumnya yang diperkaya (*enriched medium*) namun performa dalam mengidentifikasi sangat lemah. Media ini membutuhkan pemeriksaan tambahan seperti pemeriksaan biokimia dan/atau tes serologis untuk identifikasi patogen. Penapisan bakteri komensal membutuhkan waktu lama dan biaya yang mahal dalam menyediakan reagen serologis dan biokimia. Selain itu, kapasitas *Agar MacConkey* yang terbatas dalam memaksimalkan pertumbuhan patogen.<sup>14</sup> Sharmin *et al*, 2010 melaporkan Identifikasi patogen saluran kemih pada *plate* kultur primer MAC dan BA yaitu 73% dan untuk identifikasi polimikroba 12,5%.<sup>15</sup>

Media kromogenik merupakan medium generasi baru sebagai metode kultur secara cepat (18-24 jam) dalam identifikasi langsung organisme. Medium ini menghasilkan warna koloni dengan menggabungkan substrat kromogenik yang terbentuk sebagai pendeteksi warna pada koloni bakteri dengan cara hidrolisis oleh enzim bakteri yang ditargetkan sehingga memudahkan dalam membedakan patogen potensial dengan flora lainnya.<sup>16</sup> Media kromogenik memfasilitasi identifikasi langsung dari organisme bakteri dan mengurangi karakterisasi melalui tes

biokimia.<sup>15</sup> Pemeriksaan skrining yang cepat dan akurat terhadap patogen pada sampel klinis berperan penting dalam pengendalian infeksi dan pencegahan resistensi mikroorganisme terhadap agen antimikroba.<sup>17</sup> Metode ini termasuk metode yang relatif baru dengan pengurangan biaya dalam penggunaan tes biokimia. Stefaniuk *et al*, 2018 melaporkan sensitivitas dan spesifisitas kultur kromogenik yaitu 97,3% dan 93,5%.<sup>1</sup> Belum ada publikasi yang menilai sensitivitas, spesifisitas, *positive predictive value* (PPV), dan *negative predictive value* (NPV), efisiensi waktu dan biaya pada media kromogenik dan media konvensional.

Fasilitas kesehatan di wilayah perifer biasanya memiliki keterbatasan sumber daya manusia, sarana, dan keuangan sehingga metode pemeriksaan yang digunakan diupayakan yang membatasi sumber daya. Metode yang digunakan untuk identifikasi bakteri dipengaruhi beberapa faktor seperti sumber keuangan, sumber daya manusia yang terlatih, ukuran fisik laboratorium, jumlah pemeriksaan, dan akurasi. Pemeriksaan patogen ISK secara genotip mempunyai keterbatasan biaya yang besar sehingga sulit dilakukan. Pemeriksaan identifikasi bakteri secara fenotip relatif lebih murah dari genotip.<sup>18,19,20</sup>

Evaluasi media kromogenik dalam isolasi dan identifikasi langsung *E.coli* bertujuan untuk menilai sensitivitas, spesifisitas, PPV, dan NPV, efisiensi waktu, dan biaya pada media kromogenik yang dibandingkan



dengan media konvensional sehingga dapat menjadi rekomendasi dalam pemilihan media.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana nilai sensitivitas, spesifisitas, PPV (*Positive Predictive Value*), dan NPV (*Negative Predictive Value*) Media Kromogenik dan MacConkey dalam mengidentifikasi *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih wanita hamil?
2. Bagaimana perbandingan waktu inkubasi, morfologi, dan jumlah koloni pada Media Kromogenik dan MacConkey dalam kultur *Escherichia coli*?
3. Bagaimana perbandingan biaya pada Media Kromogenik dan MacConkey dalam kultur *Escherichia coli*?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengevaluasi media kromogenik dalam isolasi dan identifikasi langsung *Escherichia coli* penyebab infeksi saluran kemih pada wanita hamil.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membandingkan nilai sensitivitas, spesifisitas, PPV (*Positive Predictive Value*), dan NPV (*Negative Predictive Value*) Media Kromogenik dan MacConkey dalam mengidentifikasi *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih wanita hamil.

2. Membandingkan waktu inkubasi, morfologi, dan jumlah koloni pada Media Kromogenik dan MacConkey dalam kultur *Escherichia coli*.
3. Membandingkan biaya pada Media Kromogenik dan MacConkey dalam kultur *Escherichia coli*.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

##### 1.4.1 Manfaat keilmuan

1. Meningkatkan wawasan peneliti di bidang Mikrobiologi tentang peran identifikasi bakteri dan pertimbangan untuk memilih menggunakan media yang lebih tepat.
2. Data awal dalam identifikasi *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih wanita hamil.

##### 1.4.2 Manfaat terapan

1. Melalui penggunaan media yang dapat mengidentifikasi bakteri dengan cepat dan tepat dapat membantu menentukan penyebab infeksi sehingga pemberian antibiotika lebih tepat dan berdampak pada penurunan resistensi antibiotik.
2. Menilai kesesuaian media identifikasi antara Media Kromogenik dan MacConkey sebagai pertimbangan dalam memilih media.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertama kali diidentifikasi di dalam flora usus bayi oleh seorang dokter anak dari Jerman yang bernama Theodor Escherich (1885) yang kemudian menamai bakteri ini *Bacterium colli commune*. Nama *Escherichia* diberikan pada tahun 1920 sebagai penghargaan terhadap Theodor Escherich.<sup>21</sup>

##### 2.1.1 Taxonomi

**Tabel 2.1.** Klasifikasi bakteri *E.coli*

<i>Domain</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Phylum</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Kelas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Ordo</i>	<i>Enterobacteriales</i>
<i>Famili</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Genus</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Spesies</i>	<i>Escherichia coli</i>

Sumber: (Brooks *et al.*, 2004)

##### 2.1.2 Morfologi

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang berasal dari famili *Enterobacteriaceae* dan bersifat sebagai flora normal dalam saluran pencernaan manusia. Namun jika *E. coli* berpindah dari habitat aslinya maka akan bersifat patogenik contohnya pada ISK. Bakteri ini merupakan batang gram negatif, tidak berspora, bersifat motil dengan flagel berbentuk peritrik, bersifat anaerobik fakultatif, berukuran panjang sekitar 2,2  $\mu\text{m}$  dan

diameter 0,8  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini tidak memiliki nukleus, organel terbungkus membran maupun sitoskeleton. *E. coli* memiliki organel eksternal yaitu vili yang merupakan filamen tipis untuk menangkap substrat spesifik dan flagella yang merupakan filamen tipis dan lebih panjang untuk berenang.<sup>21,22</sup> Lapisan selubung sel yang terdapat di antara membran sitoplasma dan kapsul disebut dinding sel. Dinding sel pada bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar. Dinding sel berperan penting sebagai proteksi terhadap tekanan osmotik internal yang mencapai 5-20 atm dan juga berperan dalam pembelahan sel. Pada umumnya dinding sel bersifat permeabel non selektif. Namun, membran luar ekstrasitoplasmik bakteri Gram negatif dapat menghambat perpindahan molekul-molekul yang berukuran besar. Membran luar ini merupakan suatu lipid bilayer dengan protein, lipoprotein, dan polisakarida. Membran luar bakteri Gram negatif berhubungan dengan lingkungan termasuk pada pejamu manusia. *E. coli* dapat bertahan hidup di medium sederhana menghasilkan gas dan asam dari glukosa dan memfermentasikan laktosa.<sup>22,23</sup>

### **2.1.3 Struktur Antigenik**

*Escherichia coli* memiliki tiga jenis antigen yaitu antigen somatik (antigen O) yang bersifat tahan panas, antigen permukaan (antigen K) yang tidak tahan panas, antigen flagel (antigen H). Antigen O yang merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida dinding sel dan terdiri atas unit

polisakarida yang berulang. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terutama IgM. Antigen K berada diluar antigen O. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi melalui antiserum O dan dapat berhubungan dengan virulensi misalnya antigen K pada *E. coli* menyebabkan perlekatan bakteri pada sel epitel sebelum invasi ke saluran kemih. Antigen H terletak pada flagel dan didenaturasi atau dirusak oleh panas atau alkohol. Antigen H dipertahankan dengan memberikan formalin pada varian bakteri yang bergerak seperti pada *E. coli*.<sup>23</sup>

## **2.2 Infeksi Saluran Kemih**

### **2.2.1 Definisi**

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah istilah umum yang menggambarkan infeksi yang melibatkan bagian-bagian pada saluran kemih, seperti ginjal, ureter, vesika urinaria, dan uretra.<sup>4</sup> Standar baku dalam mendiagnosis ISK adalah deteksi patogen dalam urin dengan adanya gejala klinis. Deteksi dan identifikasi patogen dalam urin dengan pemeriksaan kultur urin (urin *midstream*). Beberapa laboratorium menetapkan jumlah koloni sebanyak  $\geq 10^4$  CFU/mL dengan adanya gejala atau tanda ISK dianggap signifikan secara klinis.<sup>7,24,25</sup>

ISK didefinisikan sebagai respon peradangan pada urothelium dalam melawan infeksi bakteri. ISK selalu dikaitkan dengan bakteriuria (adanya

bakteri dalam urin), dan pyuria (adanya sel darah putih dalam urin). Bakteriuria dapat muncul tanpa pyuria yang disebabkan oleh kontaminasi bakteri atau teknik aseptik dalam pengambilan urin. Sebaliknya, pyuria dapat muncul tanpa bakteriuria yang menandakan proses inflamasi urothelium seperti adanya batu pada saluran kemih atau keganasan.<sup>26</sup>

### **2.2.2 Klasifikasi**

Infeksi saluran kemih dapat diklasifikasikan menjadi beberapa jenis:

1. Klasifikasi berdasarkan Pedoman Infeksi Urologi EAU (*European Association of Urology*):<sup>27</sup>

a. ISK tanpa komplikasi

ISK akut, sporadis atau rekuren ISK bawah (sistitis tanpa komplikasi) dan/atau ISK atas (pielonefritis tanpa komplikasi), terbatas pada wanita tidak hamil, tanpa kelainan anatomi dan fungsional saluran kemih.

b. ISK dengan komplikasi

Semua ISK yang tidak dikategorikan dalam ISK tanpa komplikasi. Semua pria, wanita hamil, pasien dengan kelainan anatomi atau fungsional saluran kemih, kateter urin menetap, penyakit ginjal, dan/atau dengan kondisi *immunocompromise* misalnya, diabetes.

c. ISK Rekuren

ISK berulang tanpa komplikasi dan/atau dengan komplikasi dengan frekuensi minimal tiga kali dalam 1 tahun atau dua kali dalam 6 bulan.

d. ISK terkait kateter

ISK terkait kateter (*Catheter-associated urinary tract infection*) adalah ISK yang terjadi pada penggunaan kateter urin dalam 48 jam.

e. Urosepsis

Urosepsis didefinisikan sebagai disfungsi organ yang mengancam jiwa disebabkan oleh respon host terhadap infeksi yang berasal dari saluran kemih dan/atau organ genital pria.

2. Klasifikasi ISK berdasarkan gejala:

a. Bakteriuria Asimtomatik (ASB)

Isolasi bakteri dalam urin sejumlah  $1 \times 10^5$  CFU/mL pada kultur urin tanpa tanda atau gejala ISK.<sup>2</sup> Menurut *Infectious Diseases Society of America*, bakteriuria asimtomatik adalah adanya satu atau lebih spesies bakteri yang tumbuh dalam urin pada jumlah kuantitatif tertentu ( $\geq 10^5$  CFU/mL) terlepas dari adanya pyuria, tanpa adanya tanda atau gejala yang disebabkan oleh ISK.<sup>13</sup>

b. Bakteriuria Simtomatik

Bakteriuria simtomatik terbagi menjadi ISK bawah (sistitis) dan ISK atas (pielonefritis). Sistitis adalah invasi bakteri pada mukosa kandung kemih, sedangkan pielonefritis adalah peradangan yang terjadi pada parenkim ginjal, dan sistem kaliks.<sup>2</sup>

### 2.2.3 Epidemiologi

Peningkatan insiden ISK terjadi pada kelompok yang memiliki faktor risiko. Faktor risiko termasuk anatomi pada wanita, usia, diabetes, obesitas, dan aktifitas seksual. Pada wanita, 50% diantaranya memiliki setidaknya satu kali episode ISK selama hidup. Insiden ISK dengan komplikasi dikaitkan dengan faktor risiko tertentu, misalnya risiko bakteriuria meningkat 10% perhari pada pengguna kateter urin menetap dan hingga 25% bakteriuria akan berkembang menjadi ISK. Bakteriuria dapat terjadi hingga 14% pada penderita diabetes. Pada wanita hamil, insiden bakteriuria asimtomatik serupa dengan wanita tidak hamil yaitu 2%-7% dan sebanyak 40% berkembang menjadi gejala ISK. Bakteriuria asimtomatik juga cenderung meningkat seiring bertambahnya usia pada wanita dan hingga 80% pada populasi lansia.<sup>28</sup>

### 2.2.4 Etiologi

Sebagian besar ISK disebabkan oleh kolonisasi flora pada rectal dan perineum dengan saluran urogenital. Organisme yang paling sering adalah *E.coli* menjadi penyebab diatas 60% kasus. Penyebab lain yaitu *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* sp.<sup>5,6,28</sup>



## 2.2.5 Faktor Risiko

### 1. Aktifitas Seksual

Patogen penyebab ISK berada di usus, periuretra, vagina, dan saluran kemih. Hubungan seksual menyebabkan peningkatan jumlah bakteri di area periuretra vagina dan bagian distal uretra. Patogen dapat ditransfer antar individu melalui kontak langsung yaitu aktifitas seksual yang memudahkan perpindahan bakteri ke uretra pada wanita maupun pria.<sup>10,29</sup>

### 2. Jenis kelamin wanita

Wanita termasuk salah satu faktor risiko disebabkan oleh uretra yang lebih pendek, faktor risiko kehamilan, dan wanita memiliki area periuretra yang lebih lembab, serta kontaminasi saluran kemih dengan flora feses melalui perineum dan anus yang memudahkan bakteri menginfeksi dari uretra ke vesika urinaria.<sup>29</sup>

### 3. Kehamilan

Pada kondisi hamil, wanita memiliki lebih tinggi risiko mengalami pyelonefritis karena perubahan anatomis dan fungsional dari saluran kemih selama kehamilan yaitu peningkatan panjang ginjal, peningkatan filtrasi glomerulus 30 - 50 %, *hidroureteronefrosis* yang disebabkan oleh relaksasi otot polos pada ureter dan sistem kaliks akibat hormon progesteron serta kompresi mekanis vesika urinaria dan ureter dari uterus yang membesar sehingga menyebabkan refluks vesikoureter dan retensi urin.<sup>5,6</sup> Stasis urin dan hilangnya mekanisme fisiologis anti-refluks

menyebabkan kondisi yang mendukung untuk pertumbuhan bakteri dan infeksi secara *ascendens*. Faktor predisposisi lain termasuk perubahan biokimia dalam urin wanita hamil, dengan peningkatan jumlah glukosa, asam amino, dan produk degradasi hormon yang meningkatkan PH urin.<sup>6</sup>

**Tabel 2.2.** Perubahan saluran kemih pada kehamilan

Perubahan Saluran Kemih pada Kehamilan	
<b>Ginjal</b>	Peningkatan Panjang ginjal dan laju filtrasi glomerulus 30%-50%
<b>Sistem Kaliks</b>	Penurunan peristaltik
<b>Ureter</b>	Penurunan peristaltik Obstruksi mekanis
<b>Vesika Urinaria</b>	Penekanan bagian anterior dan superior Relaksasi otot polos Peningkatan kapasitas

Sumber: (Glaser *et al.*, 2015)

#### 4. Gangguan neurogenik, Obstruksi, Diabetes

Kondisi dimana urin tidak dapat sepenuhnya dikeluarkan saat melakukan pengosongan vesika urinaria akibat adanya gangguan neurogenik, obstruksi (batu saluran kemih, striktur, *prostatic hyperplasia*, penggunaan kateter urin) atau pada kondisi *immunocompromised* (adanya diabetes) juga menjadi faktor risiko ISK. Pada studi yang dilakukan di Inggris, laki-laki usia 18-39 tahun dengan diabetes memiliki risiko ISK 4 kali lebih tinggi dari laki-laki kelompok usia yang sama tanpa diabetes. Diabetes yang tidak terkontrol juga memiliki risiko yang tinggi terhadap ISK.<sup>29</sup>

Mekanisme yang berhubungan dengan kerentanan pasien DM terhadap ISK adalah faktor imunitas, perubahan faal, perlekatan bakteri pada sel uroepitelium. Faktor imunitas yaitu berupa gangguan leukosit

polimorfonuklear dalam migrasi, fagositosis, penghancuran intraseluler, dan kemotaksis. Konsentrasi glukosa yang tinggi dalam urin dapat menghambat aktivitas leukosit dan polimorfonuklear. Perubahan faal saluran kemih akibat neuropati otonom (*neurogenic bladder*) menyebabkan pengosongan kandung kemih yang tidak tuntas sehingga memudahkan kolonisasi mikroorganisme.<sup>30,31,32</sup>

#### 5. Kateter Urin

Pemasangan kateter urin meningkatkan risiko ISK 4 kali lipat lebih tinggi karena proses pemasangan kateter dapat mendorong bakteri menuju vesika urinaria dan menambah pintu masuk invasi bakteri. Pasca operasi inkontinensia urin dilaporkan kasus sebanyak 10%-32% meningkatkan risiko ISK dalam 6 minggu.<sup>29</sup>

#### 6. Lansia

Pada lansia terjadi penurunan sistem imun, atrofi mukosa vagina, penurunan hormon estrogen, adanya komorbid, inkontinensia, osteoporosis, gangguan kognitif berat, dan disabilitas. Berdasarkan survey yang dilakukan pada lansia di Amerika, 5,2% lansia mengalami ISK di panti jompo, 3,6% lansia yang mendapat perawatan kesehatan di rumah, dan 3% lansia yang dirawat di rumah sakit.<sup>29</sup>

### 2.2.6 Patogenesis

Pada keadaan normal, saluran kemih bersifat steril. Beberapa faktor yang saling mempengaruhi yaitu faktor *host*, inokulasi, dan virulensi dari

bakteri yang menginfeksi. Peristiwa awal yang terjadi pada ISK adalah inokulasi. Teori yang paling umum dari inokulasi adalah rute *ascending* bakteri dari anus ke perineum dan migrasi ke uretra dan vesika urinaria. Teori lain menyebutkan penurunan lactobacilli penghasil peroksida yang merupakan predisposisi peningkatan kolonisasi patogen enterik dan perubahan *barrier* glikosaminoglikan pada urothelium yang menyebabkan individu lebih rentan terhadap infeksi enteropatogenik.<sup>5,26</sup> Interaksi antara *host* dan patogen pada vesika urinaria menjadi penentu uropatogen berhasil dieliminasi atau kolonisasi.<sup>33</sup>

#### 1. Faktor Pejamu (*host*)

Pada anatomi normal, pengosongan vesika urinaria menjamin pengeluaran urin dan mikroorganisme patogen yang berada dalam urin secara efektif. Ketidaksempurnaan dalam pengosongan vesika urinaria akan menyebabkan adanya residu urin. Kondisi ini dapat terjadi pada refluks vesikoureter, obstruksi, atau gangguan neurogenik.<sup>29</sup>

Respon inflamasi diaktifkan oleh mediator kemotaktik yang dilepaskan pada saat bakteri patogen melekat pada dinding sel uroepitel. Mediator-mediator seperti IL-6 dan IL-8 akan menarik leukosit polimorfonuklear ke lokasi terjadinya infeksi sehingga terjadi respon inflamasi lokal. Leukosit yang tertarik ke lokasi infeksi di saluran kemih menyebabkan pyuria.<sup>10,26</sup>

## 2. Virulensi Bakteri

Tahap awal terjadinya infeksi pada saluran kemih adalah perlekatan bakteri pada sel epitel saluran kemih. Tahap selanjutnya adalah penetrasi bakteri ke jaringan uroepitel, proses inflamasi, dan kerusakan sel. Patogen pada uroepitel memiliki adhesin dalam mekanisme perlekatan. Beberapa adhesin bakteri mengenali reseptor uroepitel dan memediasi kolonisasi. Uropatogen yang mencapai ginjal menghasilkan toksin yang merusak jaringan, melewati epitel tubular ginjal dan mencapai aliran darah (bakteremia).<sup>33</sup>

*E.coli* mempunyai daya lekat pada uroepitel dengan zat adhesin pada membrane luar, kapsul, dan pili spesifik yang disebut fimbriae. Fimbriae berikatan dengan reseptor  $\alpha$ -D-Gal-4- $\beta$ -D-Gal pada mukosa uretra dan ureter.

Pili tipe I, *mannose-sensitive* berperan penting pada pembentukan kolonisasi dan invasi di vesika urinaria. Pili tipe P berperan pada pembentukan koloni di ginjal. Pili ini dikode oleh gen pap (*pyelonephritis-associated pili*). Adhesin pili tipe P (papG) mengikat globosida yang mengandung glikolipid. PapG memodulasi respon imun antibodi-sekretori lokal berinteraksi dengan TLR4 untuk mengurangi ekspresi reseptor polimer imunoglobulin (PIGR) sehingga mengganggu transportasi imunoglobulin A melalui lamina propria dan sel epitel lumen ginjal.

Terhambatnya transportasi imunoglobulin A ke saluran kemih memungkinkan *E.coli* terhindar dari mekanisme perlindungan *host*.<sup>3,33</sup>

### 2.2.7 Manifestasi Klinis

ISK bawah (sistitis) dapat muncul dengan gejala berupa nyeri saat buang air kecil (disuria), nyeri suprapubik, frekuensi, urgensi.<sup>25,34</sup> Pada wanita yang aktif secara seksual, sistitis biasanya terjadi dalam 24-48 jam setelah berhubungan seksual, terutama jika tidak diikuti dengan pengosongan kandung kemih *post coital*.<sup>10</sup> Demikian pula, pasien dengan pielonefritis menunjukkan gejala antara lain demam, nyeri pinggang, dan menggigil. Gejala nonspesifik juga dapat menyertai seperti anoreksia, malaise, mual, dan muntah, sehingga dapat didiagnosis banding dengan proses intraabdominal akut seperti apendisitis, pankreatitis, dan kolesistitis.<sup>25,34</sup>

**Tabel 2.3.** Manifestasi Klinis pada Infeksi Saluran Kemih

Manifestasi klinis Infeksi Saluran Kemih	
Tipe ISK	Gejala
<b>Sistitis</b>	Sering berkemih Rasa/sensasi terbakar/panas saat dan setelah berkemih Nyeri suprapubik, Hematuria dan/atau urin keruh
<b>Pielonefritis</b>	Demam, Menggigil Nyeri panggul/pinggang Gejala pada sistitis (mungkin tidak)
<b>Urosepsis</b>	Demam, Menggigil, Syok sepsis

Sumber : (Norrby SR, 2011)

### 2.2.8 Kriteria Diagnosis

- a. Kategori 1:  $< 10^4$  CFU per ml dilaporkan sebagai kemungkinan tidak ada ISK (Pengecualian: jika terdapat  $< 10^4$  CFU per ml dalam urin yang diambil langsung melalui punksi suprapubik atau sistoskopi)
- b. Kategori 2:  $10^4 - 10^5$  CFU per ml. Jika pasien tidak menunjukkan gejala ISK (asimtomatik), minta spesimen urin kedua dan ulang perhitungan koloni. Jika pasien memiliki gejala ISK, lanjutkan dengan tes identifikasi dan kerentanan. Jumlah bakteri pada kisaran ini sangat sugestif ISK pada pasien simtomatik atau dengan adanya leukosituria. Jika jumlah, kualitas spesimen urin, atau signifikansi gejala diragukan, ambil spesimen urin kedua dan ulang pemeriksaan.
- c. Kategori 3:  $> 10^5$  CFU per ml. Lanjutkan tes identifikasi dan kerentanan. Jumlah bakteri ini sangat sugestif ISK pada semua pasien termasuk wanita tidak bergejala.

Kemungkinan adanya kontaminasi jika terdapat lebih dari 2 spesies bakteri pada sampel urin dalam kategori 2 dan 3.<sup>24,35</sup>

### 2.3 Pemeriksaan Dipstik Urin

Pemeriksaan dipstik (*commercial reagen strip*) yang digunakan untuk pemeriksaan yang menunjang ISK adalah pemeriksaan nitrit dan leukosit esterase menggunakan carik celup pada sampel urin. Tes strip nitrit adalah tes skrining cepat untuk mendeteksi adanya sistitis, pyelonfritis, evaluasi

terapi antibiotik, dan memonitor pasien risiko tinggi ISK, sedangkan tes leukosit esterase untuk mendeteksi adanya inflamasi pada saluran kemih. Kedua tes ini dapat digunakan sebagai alat skrining spesimen kultur urin untuk menghemat biaya, namun tidak dapat menggantikan kultur urin sebagai metode utama dalam mendiagnosis ISK.<sup>36</sup>

a. Nitrit

Tes nitrit untuk melihat kemampuan bakteri mereduksi nitrat menjadi nitrit. Nitrit dideteksi dengan reaksi *Greiss* dimana nitrit pada pH asam bereaksi dengan *paraarsanilic acid* atau *sulfanilamide* membentuk senyawa *diazonium* yang kemudian bereaksi dengan senyawa *tetrahidrobenzoquinolin* menghasilkan warna merah muda. Hasil dilaporkan sebagai positif atau negatif.<sup>36,37</sup>

b. Leukosit Esterase (LE)

Tes Leukosit esterase untuk mendeteksi keberadaan esterase dalam sel darah putih granulositik (neutrofil, eosinofil, dan basofil) dan monosit. Neutrofil adalah leukosit yang paling sering dikaitkan dengan infeksi bakteri. Reaksi strip menunjukkan aksi LE dalam mengkatalisis hidrolisis *acid ester* menghasilkan senyawa *indoxyl* dan *acid indoxyl* yang kemudian bergabung dengan diazonium salt pada bantalan menghasilkan warna ungu. Reaksi LE membutuhkan waktu 2 menit. Hasil dilaporkan sebagai +1, +2, dan +3.<sup>36,37</sup>



## 2.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah teknik yang digunakan untuk menentukan apakah bakteri termasuk dalam kelompok bakteri gram positif atau gram negatif. Teknik ini dapat membedakan dua kelompok besar bakteri berdasarkan konstituen dinding sel yang berbeda. Bakteri gram positif mempertahankan warna ungu kristal violet karena pada dinding selnya memiliki lapisan *peptidoglikan* yang tebal. Sedangkan bakteri gram negatif berwarna kemerahan karena memiliki dinding *peptidoglikan* yang tipis sehingga tidak mempertahankan warna pertama (kristal violet) dan warna tersebut ikut terbuang saat proses pencucian.<sup>23</sup>

Proses ini terdiri atas tiga langkah yaitu pewarnaan awal, sel diwarnai dengan kristal violet. Selanjutnya, larutan yodium gram (yodium dan kalium iodida) ditambahkan untuk membentuk kompleks antara kristal ungu dan yodium. Kemudian tambahkan *etil* alkohol atau *aseton* pada sampel, yang akan mendehidrasi lapisan *peptidoglikan*. Kompleks kristal violet-yodium besar tidak mampu menembus lapisan *peptidoglikan* ini dan pewarna tersebut terperangkap dalam sel bakteri gram positif. Sebaliknya, membran luar bakteri gram negatif terdegradasi dan lapisan *peptidoglikan* yang lebih tipis sehingga sel bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan kompleks kristal violet-iodine dan warnanya hilang. Counterstain, seperti safranin yang larut dalam air yang lemah ditambahkan ke sampel, sehingga diwarnai merah. Karena safranin lebih ringan dari kristal violet membuat

pewarna tersebut tidak mengganggu warna ungu dalam sel gram positif. Namun, sel-sel gram negatif yang tidak berwarna menjadi berwarna merah.<sup>23,38</sup>

## **2.5 Identifikasi Bakteri Metode Kultur Urin**

### **2.5.1 Metode Kultur Urin Media Konvensional**

Kultur urin adalah pemeriksaan *gold standard* dalam mengkonfirmasi ISK.<sup>25,39</sup> Metode kultur urin dapat mengidentifikasi patogen dan uji sensitivitas patogen sehingga klinisi dapat menentukan antibiotik yang efektif.<sup>25</sup>

Semua sampel urin untuk kultur harus diproses secepat mungkin. Bila kultur urin tidak dapat segera dikerjakan, maka sampel urin diawetkan dengan menggunakan larutan asam borat atau dengan pendinginan pada suhu 4<sup>0</sup> hingga 24 jam. Sampel yang didiamkan pada suhu ruang > 4 jam dapat menumbuhkan bakteri berlebihan dan kontaminasi. Penggunaan pengawet atau pendinginan sampel membutuhkan pertimbangan yang cermat.<sup>40</sup>

Spesimen urin dipindahkan ke dalam lempeng kultur dengan menggunakan ose steril kemudian disebar menggunakan teknik *Spread-Plate* diatas permukaan dengan ose steril. Setelah inkubasi, beberapa sel yang disebarkan berkembang menjadi koloni yang terisolasi. Metode ini memungkinkan isolasi koloni dan penghitungan jumlah koloni (CFU/mL) serta tes sensitivitas. Beberapa media konvensional yang sering digunakan

adalah media BA dan agar MacConkey. Suhu medium harus dijaga antara 35-37°C dalam waktu 24-48 jam.<sup>40</sup>

### **1. Blood Agar**

Media BA adalah media dalam menumbuhkan bakteri yang digunakan untuk membedakan patogen berdasarkan efek eksotoksin bakteri hemolitik pada sel darah merah. Hemolisis adalah pecah atau lisisnya sel darah merah akibat aktifitas bakteri yang dikategorikan menjadi alfa hemolisis, beta hemolisis, dan gama hemolisis. BA dapat dimodifikasi menjadi medium selektif untuk menumbuhkan bakteri tertentu dengan cara menambahkan zat antibiotik, zat kimia atau pewarna ke dalam medium.<sup>41</sup>

Medium BA sering digunakan untuk menumbuhkan bakteri patogen yang sulit ditumbuhkan pada medium biasa, contohnya *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoe*. Di Amerika, Media BA biasanya dibuat dari *Tryptic Soy Agar* atau *Basis Columbia Agar* dengan penambahan 5% darah domba. Salah satu formula yang biasanya digunakan yaitu *Soybean-Casein Digest Agar* (atau disebut sebagai *Trypticase Soy Agar* atau *Tryptic Soy Agar* atau *BA Base*).<sup>41</sup> Komposisi medium:

**Tabel 2.4.** Komposisi Media *Blood Agar*

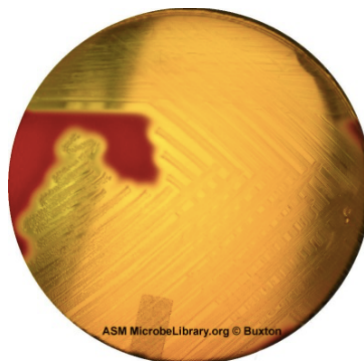
<b>Formula Soybean-Casein Digest Agar atau Blood Agar</b>	
<i>Pancreatic digest of casein</i>	15.0 g
<i>Papaic digest of soy meal</i>	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
<i>Distilled water</i>	1000 ml

Campurkan bahan dan atur pH pada 7.3. Panaskan untuk melarutkan agar dan disterilkan dengan autoclaf.  
*Blood Agar* : Untuk medium basal steril yang telah dilelehkan dan didinginkan pada suhu 45-50°C ditambahkan 5 % darah / serum domba steril pada suhu ruang. Campurkan dan hindari pembentukan gelembung, kemudian tuangkan dalam *plate* steril.

Sumber: (Buxton R, 2005)

Hemolisis pada BA ditandai terbentuknya zona bening di sekitar pertumbuhan koloni yang disebabkan oleh aktifitas bakteri. Hemolisis dikategorikan menjadi tiga yaitu beta hemolisis, alfa hemolisis, dan gamma hemolisis.<sup>41</sup>

- a. Beta hemolisis didefinisikan sebagai lisisnya sel darah merah secara total atau sempurna oleh aktifitas bakteri sehingga menyebabkan terbentuknya zona jernih atau transparan di sekitar koloni.



**Gambar 2.1.** Beta hemolisis dari bakteri *Streptococcus sp.*<sup>41</sup>

- b. Alfa hemolisis adalah reduksi hemoglobin sel darah merah menjadi methemoglobin dan menyebabkan perubahan warna medium di sekitar koloni bakteri menjadi berwarna hijau atau cokelat.

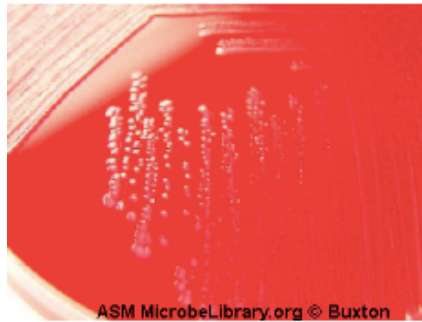


**Gambar 2.2.** Alfa hemolisis bakteri *Streptococcus* sp. (Kelompok Viridans) termasuk spesies seperti *Streptococcus mutans*, *mitis*.<sup>41</sup>



**Gambar 2.3.** Alfa hemolisis *Streptococcus pneumoniae*

- c. Gama hemolisis ditandai dengan tidak adanya perubahan warna medium di sekitar pertumbuhan koloni bakteri. Zona jernih tidak terbentuk karena tidak adanya lisis sel darah merah oleh aktifitas bakteri.



**Gambar 2.4.** Gama hemolisis *Enterococcus faecalis* (24 jam non-hemolitik)<sup>41</sup>

## 2. Agar MacConkey

Agar MacConkey dikembangkan oleh Alfred Theodore MacConkey pada awal abad ke-20 yang merupakan asisten ahli bakteri di Laboratorium Universitas Liverpool Inggris. Agar MacConkey adalah media pertumbuhan bakteri untuk mendeteksi bakteri gram negatif dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme gram positif, serta kemampuannya dalam membedakan organisme gram negatif berdasarkan metabolisme laktosa. Koloni bakteri yang mampu memfermentasikan laktosa akan berwarna merah atau merah muda sedangkan koloni yang tidak mampu memfermentasikan laktosa akan tampak tidak berubah warna atau transparan.<sup>42,43</sup>

Bakteri yang dapat diisolasi dengan medium agar MacConkey yaitu batang gram negatif *non-fastidious* terutama *Enterobacteriaceae* dan *Pseudomonas*. Adanya komposisi kristal violet dan garam empedu dalam media dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif *fastidious* seperti *Neisseria* dan *Pasteurella*. Sedangkan Gram

negatif memiliki membran sel yang resisten terhadap garam empedu sehingga bakteri ini mampu tumbuh pada MacConkey. Bakteri yang memfermentasikan laktosa menyebabkan penurunan pH media ( $\text{pH} < 6,8$ ). Saat pH turun, *Neutral Red* akan diserap oleh bakteri yang akan memberikan warna merah atau merah muda pada koloni. Bakteri yang mampu memfermentasikan laktosa dengan kuat akan menghasilkan asam untuk mengendapkan garam empedu (tampak lingkaran merah muda di sekitar koloni). Bakteri dengan fermentasi laktosa yang lemah akan tumbuh pada agar MacConkey berwarna merah muda – merah tanpa lingkaran merah muda di sekitar koloni.<sup>43</sup> Karakteristik koloni *E.coli* pada MacConkey berbentuk bulat, berukuran kecil, berwarna merah, tepi rata, permukaan cembung dengan elevasi kering-semi mukoid, dan memfermentasikan laktosa, kecuali pada Enteroinvasif *E.coli* (EIEC) penyebab diare mirip disentri / shigellosis yaitu strain *E.coli* O124 yang tidak memfermentasikan laktosa. *Klebsiella sp.* dan *Enterobacteria sp.* tampak koloni dengan elevasi mukoid (*sticky/wet colonies*). Spesies *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, dan *Pseudomonas* tidak dapat memfermentasi laktosa sehingga tidak terjadi perubahan pH yang akan membentuk koloni tampak putih/tidak berwarna.<sup>42,44</sup> Komposisi Agar MacConkey sebagai berikut:

**Tabel 2.5.** Komposisi Media MacConkey

<b>Komposisi Agar MacConkey</b>	
<i>Peptone</i>	17.0 g
<i>Proteose peptone atau Polypeptone</i>	3.0 g
<i>Lactose</i>	10.0 g
<i>NaCl</i>	5.0 g
<i>Crystal Violet</i>	1.0 mg
<i>Neutral Red</i>	30.0 g
<i>Bile Salts</i>	1.5 g
<i>Agar</i>	13.5 g
<i>Distilled Water</i>	Tambahkan sampai 1 L

Sesuaikan pH menjadi 7.1 +/- 0.2. Panaskan untuk melarutkan agar. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Sumber: (Allen, 2013)



**Gambar 2.5.** Pertumbuhan *E.coli* pada agar MacConkey<sup>43</sup>

### 2.5.2 Metode Kultur Urin Media Kromogenik

Medium agar kromogenik merupakan salah satu medium agar yang telah dikembangkan sehingga memungkinkan diferensiasi mikroorganisme yang lebih spesifik dan langsung pada lempeng primer. Identifikasi medium agar kromogenik dilakukan berdasarkan perbedaan warna dan morfologi koloni. Medium ini memfasilitasi dalam identifikasi secara langsung dari organisme bakteri dan mengurangi penggunaan uji biokimia. Selain itu, kemampuan medium ini dalam membedakan spesies basil gram negatif



dan memudahkan dalam pendeteksian serta identifikasi dugaan basil gram negatif.<sup>15</sup>

## **1. Definisi Media Kromogenik ISK**

Media kultur kromogenik ISK adalah media kultur yang digunakan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan membedakan mikroorganismenya tertentu dari populasi yang heterogen dari sampel urin. Media ini mengandung substrat kromogenik yang digunakan oleh mikroorganismenya untuk menghasilkan koloni berwarna yang spesifik untuk setiap mikroorganismenya.<sup>15,45</sup>

Media agar kromogenik ISK digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi patogen yang paling sering diisolasi pada ISK terutama *Escherichia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC), dan *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* (Proteeae). Medium ini mendukung pertumbuhan semua bakteri uropatogen tidak seperti medium agar MacConkey.<sup>15,46</sup>

## **2. Komposisi Media Kromogenik ISK**

Media kromogenik ISK mengandung nutrisi seperti pepton, asam amino, ekstrak ragi, mineral, vitamin, dan agar sama seperti komposisi pada medium kultur konvensional, yang membedakannya adalah medium ini mengandung substrat kromogenik atau kromogen. Substrat kromogenik seperti X-Gal (*6-chloro-3-Indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranoside*), X-Glu (*5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronic acid cyclohexamine salt*), dan ONPG

(*Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside*). Beberapa media kromogenik juga mengandung inhibitor tergantung tujuan mediumnya.<sup>45</sup>

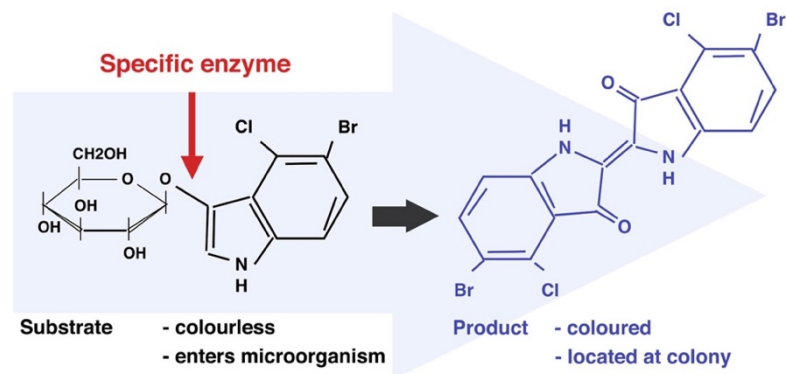
**Tabel 2.6.** Komposisi media kromogenik

<b>Formula Media Kromogenik</b>	
Komposisi	gram/liter
<i>Peptone</i>	17.2
<i>L. tryptophan</i>	0.9
<i>Hepes Buffer</i>	0.4
Kromogenik medium	6.87
Agar	18
Air	1L
pH 7.3	
Penyimpanan media pada suhu 2-8 °C, terlindung dari cahaya langsung, pada tempat yang kering dan tertutup rapat.	

Sumber: (Biomérieux, 2006)

### 3. Prinsip Media Kromogenik ISK dan Interpretasi

Media kromogenik ISK mengandung molekul tidak berwarna yang dapat larut yang disebut kromogen. Kromogen terdiri dari dua bagian yaitu substrat (target aktivitas spesifik enzimatik mikroorganisme) dan kromofor. Ketika ikatan antara substrat dan kromofor dipisahkan oleh enzim spesifik yang diproduksi oleh mikroorganisme target, kromofor akan dilepaskan. Dalam bentuknya yang tidak terkonjugasi, kromofor menunjukkan warna yang khas. Kromofor akan membentuk endapan yang memberikan warna unik pada koloni.<sup>45</sup>



**Gambar 2.6.** Mekanisme enzimatik substrat kromogenik

Media kromogenik ISK mengandung dua substrat kromogenik spesifik yang dipecah oleh enzim spesifik yang diproduksi oleh *E. coli*, *Enterococcus*, KESC. Selain itu mengandung *triptofan* yang menunjukkan aktifitas *triptofan deaminase* (TDA) yang mengidentifikasi adanya *Proteus spp.*<sup>46</sup>

*E.coli* menghasilkan enzim  $\beta$ -glukoronidase atau  $\beta$ -galaktosidase yang akan memecah substrat kromogenik 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide atau 6-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranoside akan tumbuh sebagai koloni berwarna merah muda – ungu. *E.coli* strain O157 penyebab *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) tidak menghasilkan enzim  $\beta$ -glukoronidase sehingga tumbuh sebagai koloni berwarna merah muda. Kelompok *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dan Coliforms (KESC) menghasilkan enzim  $\beta$ -glukosidase yang bereaksi dengan substrat kromogenik 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucopyranoside dan akan

tumbuh sebagai koloni berwarna biru-hijau yang memiliki morfologi koloni yang berbeda. *Enterococcus* tumbuh sebagai koloni berwarna turquoise memproduksi enzim  $\beta$ -glukosidase. *Proteus spp.* juga dapat diidentifikasi secara langsung yang menunjukkan aktifitas *triptofan deaminase* (TDA) pada media dan akan membentuk koloni berwarna coklat. *Enterobacteriaceae* lainnya menghasilkan koloni tidak berwarna karena tidak menghasilkan enzim spesifik. Koloni berwarna ungu dihasilkan oleh *Coliforms* dari pemecahan dua kromogen. Spesifisitas identifikasi pada agar kromogenik ini dapat ditingkatkan dengan melakukan tes indol.<sup>15,46,47,48</sup>

Tes indol pada identifikasi kelompok *proteaeae* dilakukan dengan menggunakan reagen ID Indol-TDA atau reagen JAMES. Koloni diletakkan pada kertas saring yang telah dibasahi dengan reagen ID indol-TDA atau reagen JAMES kemudian lihat perubahan warna setelah beberapa detik, lihat tabel 2.9.<sup>46</sup>

**Tabel 2.7.** Reaksi enzim dan warna koloni pada media kromogenik (Biomérieux)

Organisme	$\beta$ -glucoronidase	$\beta$ -glucosidase	TDA	Indol	Warna koloni
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	Merah Muda
<i>Enterococcus</i>	-	+	-		Turquoise (hijau kebiruan)
KESC	-	+	-		Hijau
<i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i>	-	-	+	+	Coklat
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	-	Coklat

Sumber: (Biomérieux, 2006)

**Tabel 2.8.** Reaksi enzim dan warna koloni pada media kromogenik (Merck)

Organisme	$\beta$ -glucoronidase	$\beta$ -galactosidase	Indol	Warna koloni
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	Biru tua-ungu
Coliform	-	+	-	Merah

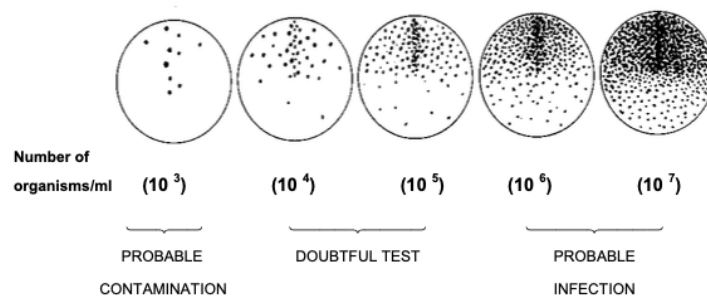
Sumber: (Merck, 2014)

**Tabel 2.9.** Reaksi Indol dalam identifikasi *Proteeae sp.*

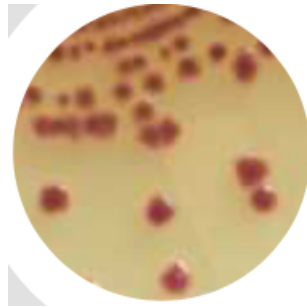
Reagen JAMES	Reagen Indol-TDA	Interpretasi	Identifikasi
Merah muda - merah	Biru	Indol +	<i>Proteus, Providencia, Morganella</i>
Tidak ada perubahan warna menjadi merah muda - merah	Tidak ada perubahan warna menjadi biru	Indol -	<i>Proteus Mirabilis</i> , konfirmasi dengan Uji Oksidase (Uji Oksidase negatif pada proteus)

Sumber: (Biomérieux, 2006)

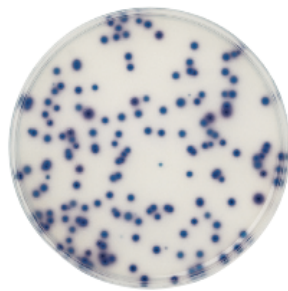
Interpretasi dan hitung jumlah koloni dilakukan setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi bakteri dalam sampel ditentukan dengan membandingkan kepadatan koloni pada agar dan pada gambar dibawah ini:



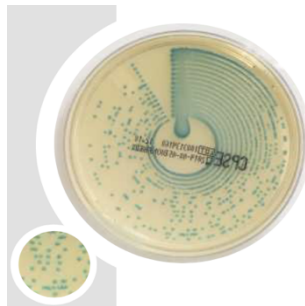
**Gambar 2.7.** Konsentrasi bakteri dalam sampel<sup>46</sup>



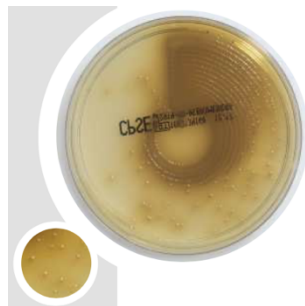
**Gambar 2.8.** *E.coli* pada media kromogenik ISK (Biomerieux)<sup>49</sup>



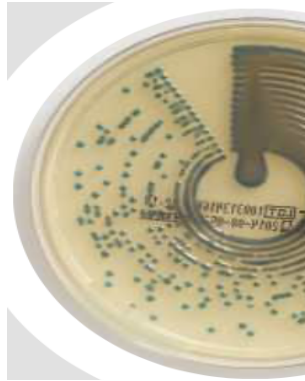
**Gambar 2.9.** *E.coli* pada media kromogenik ISK (Merck)<sup>50</sup>



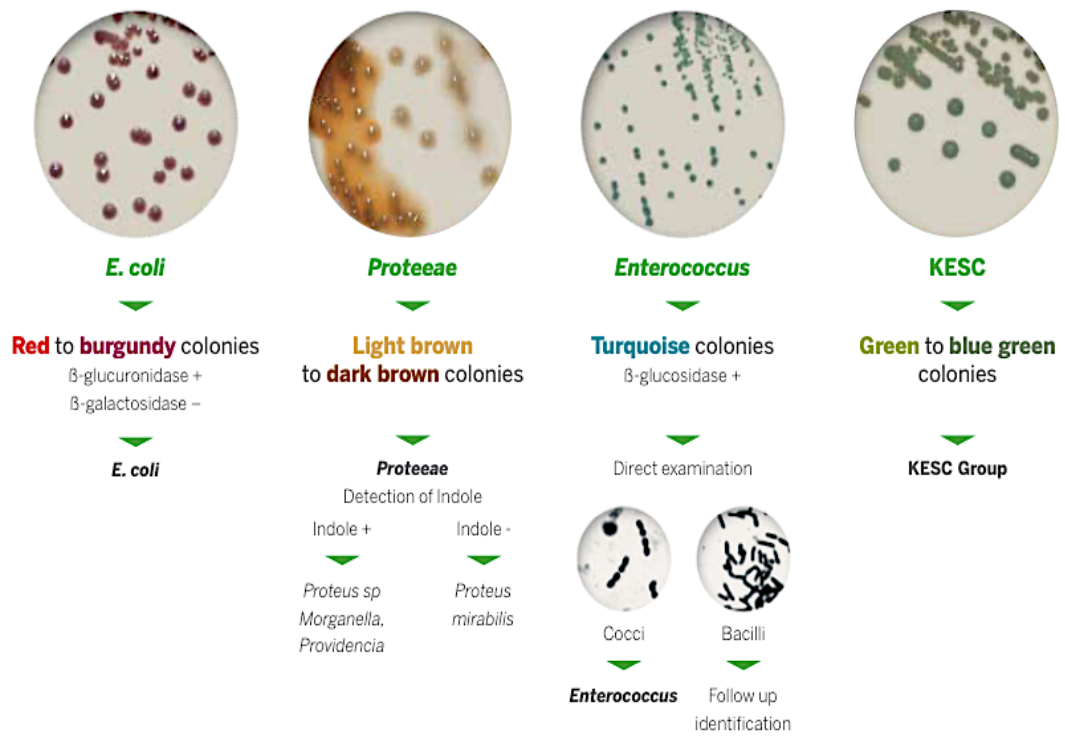
**Gambar 2.10.** *Enterococci* pada media kromogenik ISK<sup>49</sup>



**Gambar 2.11.** *Proteus mirabilis* pada media kromogenik ISK<sup>49</sup>



Gambar 2.12. *Klebsiella pneumoniae* pada media kromogenik ISK<sup>49</sup>



Gambar 2.13. Interpretasi media kromogenik ISK<sup>49</sup>

## **2.6 Tes Biokimia**

### **2.6.1 Tes Biokimia Metode Konvensional**

Aktivitas metabolisme tidak terlepas dari adanya enzim. Berdasarkan tempat bekerjanya, bakteri memiliki jenis enzim yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim yaitu enzim yang bekerja dalam sel, sedangkan eksoenzim yaitu enzim yang disekresikan ke luar sel dan berdifusi ke dalam media. Sebagian besar eksoenzim bersifat hidrolitik, dimana eksoenzim menguraikan molekul kompleks menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Molekul yang lebih kecil ini dapat memasuki sel dan digunakan untuk kepentingan sel. Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Selain itu dilihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi yang dapat digunakan untuk identifikasi.<sup>51,52</sup>

Mikroba seperti bakteri dapat dikarakterisasi dan diklasifikasi berdasarkan pada reaksi enzimatis ataupun biokimia. Bakteri dapat tumbuh pada beberapa media dan memproduksi metabolit tertentu yang dideteksi dengan interaksi antara bakteri dengan reagen tes sehingga menghasilkan warna. Sel akan memberikan respon sesuai dengan kemampuan yang dimiliki dalam bereaksi dengan reagen tes tertentu contohnya menghasilkan enzim katalase atau kemampuan untuk menghidrolisis lemak.<sup>53</sup> Setiap bakteri memiliki kemampuan dalam menggunakan enzim



yang dimilikinya untuk degradasi karbohidrat, lemak, protein, dan asam amino. Metabolisme dari molekul organik ini akan menghasilkan produk yang dapat digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi bakteri.

### **1. Reaksi Fermentasi Karbohidrat (Gula-gula)**

Fermentasi merupakan salah satu aktivitas biokimia yang dilakukan oleh mikroba. Fermentasi adalah proses perubahan senyawa makromolekul organik menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh aktivitas mikrobial pada kondisi anaerob. Fermentasi dapat menghasilkan berbagai senyawa akhir, contohnya fermentasi karbohidrat yang dapat menghasilkan berbagai senyawa asam seperti asam laktat dan propionat, ester-ester, keton dan gas.<sup>53</sup>

Sebagian besar mikroorganisme memperoleh energi dari substrat berupa karbohidrat yang selanjutnya difermentasi menghasilkan asam-asam organik (seperti asam laktat, format, asetat) dengan disertai atau tidak disertai pembentukan gas. Organisme yang berbeda akan menggunakan karbohidrat/gula-gula yang berbeda tergantung dari komponen enzim yang dimilikinya. Tes gula-gula digunakan untuk melihat adanya pembentukan asam yaitu dengan adanya perubahan warna indikator (merah *fenol* atau biru *bromtimol*) yang terdapat dalam perbenihan menjadi kuning yang sebelum ditanami berwarna merah (indikator merah *fenol*) atau berwarna biru (indikator biru *bromtimol*) serta untuk pembentukan gas, yaitu dengan terlihatnya udara di dalam tabung fermentasi (tabung durham).<sup>53</sup>

## 2. Uji Indol, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, *Simmon's Citrate*

Diferensiasi kelompok utama *Enterobacteriaceae* dapat dicapai atas dasar sifat biokimia dan reaksi enzimatik pada substrat tertentu. Tes Indol, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, dan pemanfaatan sitrat dapat digunakan untuk identifikasi ini.

- **Indol**

*Tryptophan* merupakan asam amino esensial yang dapat mengalami oksidasi dengan cara kegiatan enzimatik beberapa bakteri. Konversi *triptofan* menjadi produk metabolik dimediasi oleh enzim *tryptophanase*. Media ini biasanya digunakan dalam identifikasi yang cepat. Uji indol digunakan untuk melihat kemampuan bakteri mendegradasi asam amino *triptofan* secara enzimatik. Hasil uji indol yang diperoleh negatif karena tidak terbentuk lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan biakan, artinya bakteri ini tidak membentuk indol dari *tryptofan* sebagai sumber karbon yang dapat diketahui dengan menambahkan larutan kovaks. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme akibat penguraian protein.<sup>54</sup>

- **MR-VP (*Methyl Red*, *Voges-Proskauer*)**

Uji MR digunakan untuk mendeteksi bakteri yang memiliki kemampuan untuk mengoksidasi glukosa menghasilkan produk asam berkonsentrasi tinggi yang stabil. Indikator pH *methyl red*

(*pdimethylaminoaeobenzene-O-carboxylic acid*) untuk mengukur konsentrasi ion hidrogen antara pH 4.4 (merah) dan 6.0 (kuning). Media kultur yang berubah menjadi merah setelah penambahan *methyl red* menandakan  $\text{pH} \leq 4.4$  dari fermentasi glukosa menandakan hasil positif.<sup>55</sup>

Uji VP melihat dihasilkan asam tidak stabil dari pemecahan glukosa sehingga mudah terurai menghasilkan produk akhir non-asam atau netral seperti *acetylmethylcarbinol*. Uji VP dengan hasil positif terbentuk warna merah pada medium setelah ditambahkan  $\alpha$ -*naphthol* dan KOH, artinya hasil akhir fermentasi bakteri ini *acetylmethylcarbinol* (*asetolin*) atau terbentuk cincin merah diantara lapisan  $\alpha$ -*naphthol* dan KOH.<sup>55</sup>

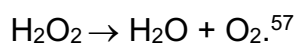
- **Simmons Citrate**

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan organisme *enteric* berdasarkan kemampuan memfermentasi sitrat sebagai sumber karbon. *Ammonium Dihydrogen Phospate* dan *Sodium Citrate* sebagai sumber nitrogen dan karbon akan tumbuh pada media ini dan menghasilkan perubahan pH. *Bromtimol blue* adalah indikator pH pada uji ini yang akan menghasilkan perubahan warna menjadi biru pada reaksi positif dan tetap hijau jika reaksi negatif.<sup>56</sup>

### 3. Uji Katalase

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob fakultatif, atau anaerob obligat, serta digunakan untuk mengetahui

kemampuan mikroorganisme untuk menguraikan *hydrogen peroksida* dengan menghasilkan enzim katalase. Bakteri yang memerlukan oksigen menghasilkan *hidrogen peroksida* ( $H_2O_2$ ) yang sebenarnya beracun bagi bakteri sendiri. Namun dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah *hidrogen peroksida* menjadi air dan oksigen dengan reaksi sebagai berikut:



#### **4. Uji Oksidase**

Uji oksidase ditujukan untuk membedakan bakteri berdasarkan aktivitas sitokrom oksidase. Enzim-enzim oksidase memainkan peran yang vital dalam pelaksanaan sistem transpor elektron pada respirasi aerob. Sitokrom oksidase mengkatalisis oksidase dari sitokrom yang tereduksi oleh oksigen molekular ( $O_2$ ) menghasilkan pembentukan  $H_2O$  atau  $H_2O_2$ . Bakteri-bakteri aerob, sebagaimana juga beberapa bakteri anaerob fakultatif dan mikroaerofil, memiliki aktivitas oksidase. Uji oksidase merupakan alat untuk membedakan antara anggota-anggota dalam genus *Neisseria* dan *Pseudomonas* yang merupakan oksidase positif, dan *Enterobacteriaceae* yang merupakan oksidase negatif.<sup>58</sup>

Kemampuan bakteri untuk menghasilkan sitokrom oksidase dapat ditunjukkan dengan penambahan pereaksi uji, *p-aminodimetilanilin oksalat*, terhadap koloni-koloni yang ditumbuhkan pada suatu media lempeng agar. Pereaksi merah muda cerah ini berperan sebagai substrat buatan,

memberikan elektron dan karenanya akan teroksidasi menjadi senyawa berwarna kehitaman dan oksigen bebas. Setelah penambahan pereaksi uji, terjadinya warna merah muda, kemudian merah tua, dan pada akhirnya warna kehitaman pada permukaan koloni menandakan dihasilkannya sitokrom oksidase dan menunjukkan hasil positif. Tidak terjadinya perubahan warna, atau warna merah muda cerah pada koloni menandakan tidak adanya aktivitas oksidase, menunjukkan hasil uji yang negatif.<sup>58</sup>

### **5. TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)**

TSIA digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi gula-gula membentuk asam saja, basa saja, asam dan basa, dengan disertai atau tidak disertai pembentukan gas. Uji ini dapat membedakan lebih jauh kelompok atau genus dalam *Enterobacteriaceae* dimana seluruhnya merupakan basil gram negatif yang dapat memfermentasi glukosa dengan memproduksi asam. Perbedaan ini didasarkan pada pola fermentasi karbohidrat dan produksi gas H<sub>2</sub>S yang berbeda untuk setiap organisme. Uji TSIA mengandung tiga macam gula-gula (*Triple Sugar*) yaitu laktosa, sukrosa, dan glukosa, indikator asam-basa merah *fenol*, dan *natrium tiosulfat* serta *ferosulfat*. Adanya pembentukan asam akan merubah warna agar yang semula berwarna jingga kemerahan menjadi kuning, sedangkan jika basa yang terbentuk, maka agar akan berubah warna menjadi merah. Adanya pembentukan gas ditandai dengan adanya gelembung/pecahnya agar di daerah tusukan dan

jika gas yang dihasilkan adalah H<sub>2</sub>S, maka akan terbentuk endapan hitam *ferosulfida* (FeS) di daerah tusukan.<sup>53,54</sup>

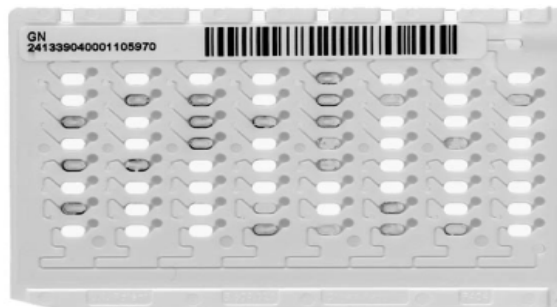
### 2.6.2 Tes Biokimia Metode VITEK 2

VITEK 2 adalah alat analisis mikrobiologi otomatis dengan metode *fluorescent* untuk mengidentifikasi bakteri dan uji kepekaan antibiotik.<sup>59</sup> Metode ini mampu mengidentifikasi beberapa organisme yang berbeda, yaitu: Gram Negatif (GN), Gram Positif (GP), Jamur (YST), dan Batang gram positif pembentuk spora (BCL). VITEK 2 menggunakan *colorimetric reagent cards* yang ditafsirkan secara otomatis, dengan menilai reaksi biokimia, pemakaian karbon pada substrat dan aktivitas enzim.<sup>60</sup>

Kartu reagen memiliki 64 lubang yang masing-masing dapat berisi substrat. Substrat tersebut mengukur aktifitas metabolik, seperti asidifikasi, alkalinisasi, hidrolisis enzim, dan pertumbuhan dengan adanya zat inhibitor. Setiap kartu memiliki tabung transfer yang digunakan untuk inokulasi. Kartu memiliki *bar codes* yang berisi informasi tentang jenis produk, nomor, tanggal kadaluwarsa, dan pengenal sampel yang dapat ditautkan sebelum atau setelah memuat kartu ke sistem.<sup>60</sup>

Pemilihan kartu yang dipakai pada pemeriksaan identifikasi bakteri berdasarkan hasil pengecatan Gram pada isolat bakteri. Kartu GN digunakan untuk bakteri aerob Gram negatif (gambar 2.14) sedangkan kartu GP untuk bakteri aerob kokus Gram positif dan batang tanpa spora. Kartu ANC dipakai untuk identifikasi mikroorganisme anaerob dan

*Corynebacterium sp.* Kartu BCL digunakan untuk identifikasi bakteri Gram positif yang membentuk spora. Pada setiap pemeriksaan, VITEK 2 menggunakan dua kartu yaitu kartu untuk identifikasi bakteri dan tes kepekaan antibiotika.<sup>59,60</sup>



**Gambar 2.14.** Kartu identifikasi kolorimetrik Gram negatif VITEK 2<sup>60</sup>

VITEK 2 menggunakan botol kultur BacT/ALERT FA Plus untuk menumbuhkan bakteri aerobik dan anaerobik termasuk jamur. Pertumbuhan bakteri yang positif dideteksi secara kolorimetri dan refleksi cahaya. Bakteri yang tumbuh akan memproduksi karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) akibat metabolisme substrat media kultur. BacT/Alert FA Plus mengandung 1,6 g *adsorbent polymeric bead* dan 30 mL media kompleks. Adsorbent polymeric bead bermanfaat dalam menetralkan antibiotika. Antibiotika yang dapat dinetralkan dengan *adsorbent polymeric bead* seperti *penicillin*, *glycylcyclines*, *polyenes*, *macrolide*, *triazole*, *echinocandin*, *cefazolin*, *cefoxitin*, *ceftraxoline*, *aminoglycoside*, *fluoroquinolon*, *lincosamide*, *glycopeptide*, dan *oxazolidinone*. *Cefotaxime* dan *ceftriaxone* dineutralisasi

tidak sempurna sedangkan *ceftazidime* dan *cefepime* tidak dapat dineutrasiasi.<sup>59,60</sup>

Media kompleks terdiri dari *casein peptone* 1%, *yeast extract* 0,45%, *soybean peptone* 0,3 %, *meat peptone* 0,1 %, *sodium polyanethol sulfonate* (SPS) 0,083%, *menadione* 0,00005%, *hemin* 0,0005%, *L-cysteine* 0,03%, *pyruvic acid* 0,1%, *pyridoxine* HCl 0,001%, *nicotinic acid* 0,0002%, *panthothenic acid* 0,0002%, *thiamine* HCl 0,0001% , kompleks asam amino dan subtrat karbohidrat. Botol BacT/ALERT FA Plus juga mengandung gas N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub>. Botol BacT/ALERT yang sudah diisi spesimen sebaiknya segera diletakkan di BacT/ALERT *microbial detection system*. Pertumbuhan bakteri positif pada BacT/ALERT tetapi tidak didapatkan pertumbuhan pada subkultur biasanya disebabkan oleh bakteri fastidious yang memerlukan media khusus seperti *Haemophilus sp* dan *Neisseria sp*. Spesimen darah dengan kadar leukosit yang tinggi juga dapat dideteksi positif di BacT/ALERT tetapi hasil pengecatan Gram dan subkultur negatif.<sup>60,61,62</sup>

Setiap kartu berisi *film optic* yang mencegah tercampurnya substrat dan berfungsi untuk mengalirkan oksigen. Kartu identifikasi diinokulasi dengan suspensi mikroorganisme menggunakan vakum. Suspensi mikroorganisme yang dimasukkan dalam tabung ditempatkan ke dalam rak khusus dan kartu identifikasi diletakkan di slot sebelahnya kemudian tabung transfer dimasukkan ke dalam tabung suspensi. Suspensi bakteri akan



diaspirasi secara otomatis ke dalam sumuran kartu. Kaset dapat menampung hingga 15 tes. Identifikasi bakteri dinilai secara optikal berdasarkan reaksi uji biokimia yang memerlukan waktu sekitar 15 menit.<sup>60</sup>

Kartu identifikasi Gram negatif VITEK 2 (GN) didasarkan pada aktivitas biokimia, pemakaian karbon, dan aktivitas enzim dalam identifikasi otomatis untuk bakteri Gram negatif *non fastidious* baik yang memfermentasi maupun yang tidak memfermentasi laktosa. Kartu GN mempunyai 47 tes biokimia dan 1 kontrol negatif. Hasil identifikasi bakteri akan selesai dalam waktu kurang dari 10 jam.<sup>62</sup> Daftar tes biokimia dapat dilihat pada tabel 2.10. Kartu identifikasi Gram positif VITEK 2 GP merupakan kartu identifikasi untuk bakteri *coccus* Gram positif. Kartu GP terdapat 43 uji biokimia yang mengukur penggunaan karbon, aktivitas enzimatik, dan resistensi. Hasil identifikasi dapat selesai kurang dari 8 jam.<sup>61</sup> Daftar uji biokimia dapat dilihat pada tabel 2.11. Sebelum dipakai sebaiknya diperiksa tanggal kedaluwarsa, keutuhan kemasan, dan keutuhan dan keberadaan *dessicant*. Kartu disimpan pada suhu 2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C dalam kemasan yang tertutup. Sebelum dipakai, kartu dibiarkan dulu pada suhu ruang sebelum kemasan dibuka. Pengerjaan pemeriksaan sebaiknya memakai sarung tangan yang tidak mengandung serbuk karena dapat berpengaruh terhadap *optic*.<sup>62,61</sup>

**Tabel 2.10.** Uji biokimia pada kartu GN VITEK 2

No.	Sumuran	Uji Biokimia	Singkatan	Jum.dalam sumuran
1	2	<i>Ala-Phe-Pro Arylamidase</i>	APPA	0,04 mg
2	3	<i>Adonitol</i>	ADO	0,19 mg
3	4	<i>L-Pyrrolydonyl-Arylamidase</i>	PyrA	0,02 mg
4	5	<i>L-Arabitol</i>	IARL	0,30 mg
5	7	<i>D-Cellobiose</i>	dCEL	0,030 mg
6	9	<i>Beta-Galactosidase</i>	BGAL	0,04 mg
7	10	<i>H<sub>2</sub>S</i>	H <sub>2</sub> S	0,01 mg
8	11	<i>Beta-N-Acetyl Glucosaminidase</i>	AGLTp	0,03 mg
9	12	<i>Glutamyl Arylamidase Pna</i>	AGL Tp	0,03 mg
10	13	<i>D-Glucose</i>	dGlu	0,30 mg
11	14	<i>Gamma-Glutamyl-Transferase</i>	GGT	0,02 mg
12	15	<i>Fermentation/Glucose</i>	OFF	0,45 mg
13	17	<i>Beta-Glucosidase</i>	BGLU	0,30 mg
14	18	<i>D-Maltose</i>	dMAL	0,3 mg
15	19	<i>D-Mannitol</i>	dMAN	0,1875 mg
16	20	<i>D-Mannose</i>	dMNE	0,3 mg
17	21	<i>Beta-Xylosidase</i>	BXYL	0,0424 mg
18	22	<i>Beta-Alanine-arylamidase pNA</i>	BAIap	0,0174 mg
19	23	<i>L-Proline Arylamidase</i>	ProA	0,0234 mg
20	26	<i>Lipase</i>	LIP	0,0192 mg
21	27	<i>Palatinose</i>	PLE	0,3 mg
22	29	<i>Tyrosine Arylamidase</i>	TyrA	0,0276 mg
23	31	<i>Urease</i>	URE	0,15 mg
24	32	<i>D-Sorbitol</i>	dSOR	0,1875 mg
25	33	<i>Saccharose</i>	SAC	0,3 mg
26	34	<i>D-Tagatose</i>	dTAG	0,3 mg
27	35	<i>D-Trehalose</i>	dTRE	0,3 mg
28	36	<i>Citrate</i>	CIT	0,054 mg
29	37	<i>Malonate</i>	MNT	0,15 mg
30	39	<i>5-Keto-D-Gluconate</i>	5KG	0,3 mg
31	40	<i>L-Lactate</i>	ILATk	0,15 mg
32	41	<i>Alpha-Glukosidase</i>	AGLU	0,036 mg
33	42	<i>Succinate alkalization</i>	SUCT	0,15 mg
34	43	<i>Beta-N-Acetyl-Galactosaminidase</i>	NAGA	0,0306 mg
35	44	<i>Alpha-Galactosaminidase</i>	AGAL	0,036 mg
36	45	<i>Phosphatase</i>	PHOS	0,0504 mg

**Tabel 2.10.** Uji biokimia pada kartu GN VITEK 2 (lanjutan)

No.	Sumuran	Uji Biokimia	Singkatan	Jum.dalam sumuran
37	46	<i>Glycine Arylamidase</i>	GlyA	0,012 mg
38	47	<i>Ornithine decarboxylase</i>	ODC	0,3 mg
39	48	<i>Lysine decarboxylase</i>	LDC	0,15 mg
40	52	<i>Decarboxylase base</i>	ODEC	NA
41	53	<i>L-Histidine assimilation</i>	IHISa	0,087 mg
42	56	<i>Courmarate</i>	CMT	0,126 mg
43	57	<i>Beta-Gluconidase</i>	BGUR	0,0378 mg
44	58	<i>O/129 Resistance</i>	O129R	0,0105 mg
45	59	<i>Glu-Gly-Arg-Arylamidase</i>	GGAA	0,0576 mg
46	61	<i>L-Malate assimilation</i>	IMLTa	0,042 mg
47	62	<i>ELLMAN</i>	ELLM	0,03 mg
48	64	<i>L-Lactate assimilation</i>	ILATa	0,186 mg

Sumber: (BioMérieux, 2016)

**Tabel 2.11.** Uji biokimia pada kartu GP VITEK 2

No.	Sumuran	Uji Biokimia	Singkatan	Jum.dalam sumuran
1	2	<i>D-amygdalin</i>	AMY	0,1875 mg
2	4	<i>PhosphatidylinositolphospholipaseC</i>	PIPLC	0,015 mg
3	5	<i>D-Xylose</i>	dXYL	0,3 mg
4	8	<i>Arginine dihydrolase</i>	ADH 1	0,111 mg
5	9	<i>Bera-Galactosidase</i>	BGAL	0,036 mg
6	11	<i>Alpha-Glucosidase</i>	AGLU	0,036 mg
7	13	<i>Ala-Phe-Pro Arylamidase</i>	APPA	0,0384 mg
8	14	<i>Cyclodextrin</i>	CDEX	0,3 mg
9	15	<i>L-Aspartate Arylamidase</i>	AspA	0,024 mg
10	16	<i>Beta Galactopyranosidase</i>	BGAR	0,00204mg
11	17	<i>Alpha-Mannosidase</i>	AMAN	0,036 mg
12	19	<i>Phosphatase</i>	PHOS	0,0504 mg
13	20	<i>Leucine Arylamidase</i>	LeuA	0,0234 mg
14	23	<i>L-Proline Arylamidase</i>	ProA	0,0234 mg
15	24	<i>Beta Glucuronidase</i>	BGURr	0,0018 mg
16	25	<i>Alpha Galactosidase</i>	BGAR	0,00204mg
17	26	<i>L-Pyrrolydonyl-Arylamidase</i>	PyrA	0,018 mg
18	27	<i>Beta-Glucoromidase</i>	BGUR	0,0378 mg
19	28	<i>Alanine Arylamidase</i>	PyrA	0,018 mg
20	29	<i>Tyrosine Arylamidase</i>	TyrA	0,0276 mg
21	30	<i>D-Sorbitol</i>	dSOR	0,1875 mg

**Tabel 2.11.** Uji biokimia pada kartu GP VITEK 2 (lanjutan)

No.	Sumuran	Uji Biokimia	Singkatan	Jum.dalam sumuran
22	31	<i>Urease</i>	URE	0,15 mg
23	32	<i>Polymixin B Resistance</i>	POLYB	0,00093 mg
24	37	<i>D-Galactosa</i>	dGAL	0,3 mg
25	38	<i>D-Ribosa</i>	dRIB	0,3 mg
26	39	<i>L-Lactate alkalization</i>	ILATk	0,15 mg
27	42	<i>Lactose</i>	LAC	0,96 mg
28	44	<i>N-Acetyl-D-Glucosamine</i>	NAG	0,3 mg
29	45	<i>D-Galactosa</i>	dMAL	0,3 mg
30	46	<i>Bacitracin resistance</i>	BACI	0,0006 mg
31	47	<i>Novobiocin resistance</i>	NOVO	0,000075mg
32	50	<i>Growth 6,5%NaCl</i>	NC 6,5%	1,68 mg
33	52	<i>D-Manitol</i>	dMAN	0,1875 mg
34	53	<i>D-Mannose</i>	dMNE	0,3 mg
35	54	<i>Methyl-B-Glucoopyranoside</i>	MBdG	0,3 mg
36	56	<i>Pullulan</i>	PUL	0,3 mg
37	57	<i>D-Raffinose</i>	dRAF	0,3 mg
38	58	<i>O/129 Resistance(comp.vibrio)</i>	O129R	0,0084 mg
39	59	<i>Salicin</i>	SAL	0,3 mg
40	60	<i>Saccharose/sucrose</i>	SAC	0,3 mg
41	62	<i>D-Trehalose</i>	dTRE	0,3 mg
42	63	<i>Arginine Dihidrolase 2</i>	ADH2s	0,27 mg
43	64	<i>Optochin resistance</i>	OPTO	0,000399mg

Sumber: (BioMérieux, 2016)

Keterangan : sumuran yang lain merupakan sumuran kosong

Reaksi biokimia dari mikroorganisme yang diuji akan dibandingkan dengan database karakteristik mikroorganisme. Jika pola identifikasi yang unik tidak dikenal maka akan diperlihatkan tabel mikroorganisme yang mungkin. Lembaran hasil akan menyarankan untuk melakukan pemeriksaan tambahan jika diperlukan. *Software* akan memberikan hasil *percent probality*. Probalitas 96% - 99% dinyatakan sebagai *excellent*, 93% - 95% sebagai *very good*, 89% - 92% sebagai *good*, 85% - 88% sebagai *acceptable* dan keberadaan dua sampai tiga taxa yang memiliki pola yang

sama dinyatakan sebagai *low discrimination*, dan lebih dari tiga taxa dinyatakan sebagai *Unidentified Organism*.<sup>60</sup>

### 2.6.3 Tes Biokimia Metode *Analytical Profile Index (API)*

Metode *Analytical Profile Index (API)* adalah panel uji biokimia untuk mengidentifikasi bakteri seperti *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Yeast*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Bacillus* dan *Neisseria*.<sup>63</sup> Metode API terdiri dari strip plastik yang tersusun dari *tube* dan *cupules* (gambar 2.15). Setiap *tube* berisi substrat yang terdehidrasi untuk tes biokimia yang berbeda. Daftar lengkap bakteri yang dapat diidentifikasi metode ini dapat dilihat pada lembar rujukan API. Sebelum digunakan untuk pemeriksaan, sebaiknya periksa terlebih dahulu tanggal kadaluwarsa reagen dan strip API, keutuhan kemasan dan komponen, kerusakan *cupule* dan *desiccant*. Strip dan media disimpan pada suhu 2-8°C sampai tanggal kadaluwarsa. Langkah pemeriksaan identifikasi meliputi persiapan strip, persiapan inokulum, inokulasi strip, pembacaan, dan interpretasi hasil. Persiapan strip dilakukan dengan menyiapkan kotak inkubasi yang terdiri dari nampan dan tutup nampan. *Honey combed* dalam nampan diisi dengan 5 mL *distilled water* atau *demineralized water* untuk membuat suasana lembab.<sup>63</sup>

**Tabel 2.12.** Jenis pemeriksaan metode API

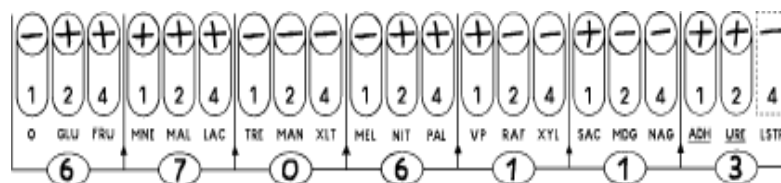
Jenis API	Mikroorganisme	Suspensi	Mc Farland	Inkubasi	Atmosfer
<b>API 20E</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> , Batang Gram negatif non fastidius lain	5mL NaCL 0,85%	1 koloni	37 <sup>0</sup> C 18-24 jam	Aerob
<b>Rapid 20E</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	5mL NaCL 0,85%	0,5	37 <sup>0</sup> C 4 jam	Aerob
<b>API 10S</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> , Batang Gram negatif non fastidius lain	5mL NaCL 0,85%	1 koloni	37 <sup>0</sup> C 18-24 jam	Aerob
<b>API 20NE</b>	Non <i>Enterobacteriaceae</i> , Batang Gram negatif non fastidius lain	2mL NaCL 0,85%	0,5	37 <sup>0</sup> C 24-48 jam	Aerob
<b>API STAPH</b>	<i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	API Staph medium	0,5	37 <sup>0</sup> C 24-48 jam	Aerob
<b>API 20 STREP</b>	<i>Streptococcus</i>	2mL API 20 Strep medium	4	37 <sup>0</sup> C 24-48 jam	Aerob
<b>API Coryne</b>	<i>Corynebacterium sp</i>	3mL medium	6	37 <sup>0</sup> C 24 jam	Aerob
<b>Api Listeria</b>	<i>Listeria</i>	2mL medium	1	37 <sup>0</sup> C 18-24 jam	Aerob
<b>API Candida</b>	<i>Yeast</i>	2mL NaCL 0,85%	3	37 <sup>0</sup> C 18-24 jam	Aerob
<b>API 20 AUX</b>	<i>Yeast</i>	2mL NaCL 0,85%	2	30 <sup>0</sup> C 48-72 jam	Aerob
<b>API 20 A</b>	Anaerob	API 20A medium	3	37 <sup>0</sup> C 24 jam	Anaereob
<b>API Campy</b>	<i>Campylobacter</i>	3mL NaCL 0,85%	6	37 <sup>0</sup> C 24-48 jam	Aerob
<b>API NH</b>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	2mL NaCL 0,85%	4	37 <sup>0</sup> C 2 jam	Aerob
<b>API 50 CH</b>	<i>Bacillus</i>	2mL NaCL 0,85% + medium	2	30 <sup>0</sup> C 24-48 jam	Aerob
<b>API 50 CHL</b>	<i>Lactobacillus</i>	API CHL	2	37 <sup>0</sup> C 48 jam	Aerob

Sumber: (BioMérieux, 2019)



Gambar 2.15. Strip plastik API<sup>63</sup>

Proses metabolisme selama inkubasi akan menghasilkan perubahan warna pada substrat baik terjadi secara spontan ataupun setelah penambahan reagen tambahan. Identifikasi bakteri diperoleh melalui profil angka. Lembar hasil tes terdiri dari tiga kelompok *microtube* yang berisi angka 1,2 dan 4. Hasil positif dijumlahkan sehingga diperoleh tujuh digit angka. Tujuh digit angka tersebut kemudian dicocokkan dengan tabel profil atau dapat dimasukkan hasil positif dan negatif ke [apiweb<sup>TM</sup>](http://apiweb.com).<sup>63</sup>



6 706 113 *Staphylococcus epidermidis*

Gambar 2.16. Contoh lembar hasil API<sup>63</sup>

## 1. API Staph

API Staph adalah metode identifikasi bakteri genus *Staphylococcus*, *Micrococcus*, dan *Kocuria* dengan menggunakan tes biokimia dalam *microtube* dan *database* yang dimodifikasi. API Staph terdiri dari 20 *microtube* yang mengandung *dehydrated substrat* yang akan diinokulasi dengan suspensi bakteri. Alat dan bahan yang diperlukan untuk identifikasi

bakteri dengan metode ini antara lain strip API Staph, media API Staph, *mineral oil*, reagen VP 1 + VP 2, reagen NIT 1 + NIT 2, reagen ZYM A + ZYM B, standar Mc Farland, pipet atau PSlpettes, rak ampul, dan pelindung ampul.<sup>64</sup>

Isolat bakteri yang dipakai merupakan subkultur bakteri pada media *Columbia Blood Agar* yang diperiksa secara morfologi, kemurnian isolat, pewarnaan Gram, dan uji katalase untuk menentukan apakah termasuk *Micrococcaeeae*. Isolat bakteri menggunakan kultur yang telah berumur 18-24 jam kemudian isolat tersebut diambil dan dibuat suspensi bakteri 0,5 Mc Farland dan melarutkan isolat ke media API.<sup>64</sup>

Saat isolat bakteri diinokulasikan ke strip API Staph dengan *pipette*, usahakan untuk tidak terbentuk gelembung udara pada *tube* dengan memiringkan strip ke depan dan ujung tip *pipette* diletakkan pada sisi *cupule*. Tambahkan *mineral oil* untuk tes ADH dan URE untuk membuat suasana anaerob sampai terbentuk *convex meniscus*. Kemudian tutup nampan strip dan inkubasi dalam 18-24 jam pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , setelah itu lakukan pembacaan strip. Beberapa tes kimia memerlukan satu tetes reagen tambahan, kemudian ditunggu 10 menit untuk dilakukan pembacaan strip seperti pada tes VP ditambahkan reagen VP 1 dan VP 2, tes NIT ditambahkan reagen NIT 1 dan NIT 2, tes PAL ditambahkan reagen ZYM A dan ZYM B. Hasil tes biokimia pada API Staph dapat dilihat pada tabel 2.13.



**Tabel 2.13.** Tes biokimia pada API Staph

Test	Komposisi	Reaksi	Hasil	
			Negatif	Positif
<b>0</b>	Tanpa substrat	Kontrol negatif	Merah	-
<b>GLU</b>	<i>D-glukosa</i>	Kontrol positif	Merah	Kuning
<b>FRU</b>	<i>D-Fruktosa</i>	Fermentasi fruktosa	Merah	Kuning
<b>MNE</b>	<i>D-Manosa</i>	Fermentasi mannosa	Merah	Kuning
<b>MAL</b>	<i>D-Maltosa</i>	Fermentasi maltosa	Merah	Kuning
<b>LAC</b>	<i>D-laktosa</i>	Fermentasi laktosa	Merah	Kuning
<b>TRE</b>	<i>D-trehalosa</i>	Fermentasi trehalosa	Merah	Kuning
<b>MAN</b>	<i>D-manitol</i>	Fermentasi manitol	Merah	Kuning
<b>XLT</b>	<i>Xylitol</i>	Fermentasi xylitol	Merah	Kuning
<b>MEL</b>	<i>D-melibiose</i>	Fermentasi melibiose	Merah	Kuning
<b>NIT</b>	<i>Potassium nitrate</i>	Reduksi nitrat menjadi nitrit	Pucat-merah muda pucat	Merah
<b>PAL</b>	<i>β Naphthyl phosphate</i>	Alkaline phosphatase	Kuning	Violet
<b>VP</b>	<i>Sodium pyruvate</i>	Produksi Acetyl methyl carbinol (VP)	Tidak berwarna – merah muda pucat	Violet-merah muda
<b>RAF</b>	<i>D-rafinose</i>	Fermentasi raffinosa	Merah	Kuning
<b>XYL</b>	<i>D-xylose</i>	Fermentasi xylosa	Merah	Kuning
<b>SAC</b>	<i>D-saccharose</i>	Fermentasi saccharosa	Merah	Kuning
<b>MDG</b>	<i>Methyl αD-glucopyranoside</i>	Fermentasi methyl αD-glucopyranoside	Merah	Kuning
<b>NAG</b>	<i>N acethyl glucosamine</i>	Fermentasi N acethyl glucosamine	Merah	Kuning
<b>ADH</b>	<i>L-Arginine</i>	Arginine dihydrolase	Kuning	Oranye-merah
<b>URE</b>	<i>Urea</i>	Urease	Kuning	Merah-violet

Sumber: (BioMérieux, 2019)

## 2. API 20 Strep

API Strep merupakan tes biokimia untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus* dan *Enterococcus*. Strip API 20 Strep terdiri dari 20 tes biokimia yang terdiri dari *minitube* yang berisi *dehydrated substrate* untuk memperlihatkan aktivitas enzim atau fermentasi gula. Proses metabolisme selama inkubasi akan memerlukan suspensi bakteri dengan tingkat kekeruhan yang pekat dan berasal dari koloni murni.<sup>65</sup>

Isolat bakteri yang dipakai merupakan subkultur bakteri pada media *Columbia Blood Agar* yang berumur 18-24 jam yang diinkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( *$\beta$  haemolytic Streptococcus dan Enterococci*) atau 48 jam untuk *Streptococcus sp.* lainnya dalam suasana anaerob. Bakteri *fastidious* dikultur pada *Schaedler broth* pada  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 5 jam kemudian seluruh koloni digenangkan di *Columbia Blood Agar* dan diinkubasi lagi selama 18-24 jam. Isolat bakteri yang murni diambil dan dibuat suspensi bakteri dengan kekeruhan lebih dari 4 Mc Farland dengan melarutkan isolat ke media API Strep (volume 2 mL).<sup>65</sup>

Suspensi bakteri diinokulasikan dahulu ke tes VP, HIP, ESC, PYRA,  $\alpha$ GAL,  $\beta$ GUR,  $\beta$ GAL, PAL, LAP, dan ADH. Dusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Tes VP sampai LAP diinokulasi sekitar 100 $\mu$ L. Untuk tes RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD, dan GLYG disiapkan suspensi baru. *Ampule* API GP medium dibuka, dan semua sisa suspensi

bakteri dimasukkan ke dalamnya dan dicampur secara merata. Suspensi baru ini kemudian diinokulasikan ke tes tersebut untuk mengisi bagian *tube* saja, *cupule* tidak terisi suspense. Tes yang ditandai dengan tanda garis bawah “\_\_\_” (ADH sampai GLYG) diberi *mineral oil* sampai terbentuk meniskus yang konveks, kemudian strip ditutup dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 4-4,5 jam dalam suasana aerob. Strip kemudian dibaca, jika bakteri belum teridentifikasi maka dilanjutkan dengan inkubasi kedua selama 24 jam untuk pembacaan kedua.<sup>65</sup>

Setelah inkubasi 4 jam, maka ditambahkan 1 tetes reagen VP1 dan VP2 untuk tes VP, 2 tetes reagen NIN untuk tes HIP, serta masing-masing satu tetes reagen ZYM A dan ZYM B untuk tes PYRA,  $\alpha$ GAL,  $\beta$ GUR,  $\beta$ GAL, PAL, dan LAP. Hasil dibaca dengan memasukkan data ke *apiweb*. Inkubasi ulang dikerjakan jika hasil bacaan *apiweb* pada inkubasi pertama “*low discrimination*”, “*unacceptable*”, “*doubtful*” atau “*not valid*”. Inkubasi kedua ini untuk membaca tes ESC, ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD dan GLYG. Reaksi enzimatik tidak boleh dibaca ulang.<sup>65</sup>

**Tabel 2.14.** Tes biokimia pada API 20 Strep

Test	Komposisi	Reaksi/Enzim	Hasil			
			Negatif		Positif	
<b>VP</b>	<i>Sodium pyruvate</i>	Produksi <i>acetoin</i>	Tak berwarna		Merah muda-merah	
<b>HIP</b>	<i>Hippuric acid</i>	Hidrolisis ( <i>Hippuric acid</i> )	Tak berwarna, pucat kebiruan/kehijauan		Biru gelap/Ungu	
<b>ESC</b>	<i>Esculin ferric citrate</i>	$\beta$ -glucosidase hydrolysis	<b>4 jam</b>	<b>24 jam</b>	<b>4 jam</b>	<b>24 jam</b>
			Tak Berwarna, kuning pucat	Tak berwarna kuning pucat, hijau terang	Hitam, abu-abu	Hitam
<b>PYRA</b>	<i>Pyroglutamic acid-<math>\beta</math>naphthylamide</i>	<i>Pyrrolidonyl arylamidase</i>	Tak berwarna, pucat		Oranye	
<b><math>\alpha</math>GAL</b>	<i>6-bromo-2-naphthyl <math>\alpha</math>Dgalactopyranoside</i>	$\alpha$ Galactosidase	Tak berwarna		Oranye	
<b><math>\beta</math>GUR</b>	<i>NaphtholASBI-glucuronic</i>	$\beta$ Glucoronidase	Tak berwarna		Biru	
<b><math>\beta</math>GAL</b>	<i>2-naphthyl <math>\beta</math>D galactopyranoside</i>	$\beta$ Galactosidase	Tak berwarna, pucat		Ungu	
<b>PAL</b>	<i>2 naphthyl phosphate</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	Tak berwarna, pucat		Ungu	
<b>LAP</b>	<i>L leucine <math>\beta</math>naphthylamide</i>	<i>Leucine aminopeptidase</i>	Tak berwarna		Oranye	
<b><u>ADH</u></b>	<i>L arginine</i>	<i>Arginine dihydrolase</i>	Kuning		Merah	
<b><u>RIB</u></b>	<i>D ribose</i>	<i>acidificaation</i>	<b>4 jam</b>	<b>24 jam</b>	<b>4 jam</b>	<b>24 jam</b>
			Merah	Oranye -merah	Oranye/ kuning	Kuning
<b><u>ARA</u></b>	<i>L arabinose</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye -merah	Oranye/ kuning	Kuning
<b><u>MAN</u></b>	<i>D manitol</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye -merah	Oranye/ kuning	Kuning
<b><u>SOR</u></b>	<i>D sorbitol</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/ kuning	Kuning

**Tabel 2.14.** Tes biokimia pada API 20 Strep (lanjutan)

Test	Komposisi	Reaksi/Enzim	Hasil			
			Negatif		Positif	
<b>LAC</b>	<i>D lactose</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning
<b>TRE</b>	<i>D trehalose</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning
<b>INU</b>	<i>Inulin</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning
<b>RAF</b>	<i>D raffinose</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning
<b>AMD</b>	<i>Starch</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning
<b>GLYG</b>	<i>Glycogen</i>	<i>acidification</i>	Merah	Oranye-merah	Oranye/kuning	Kuning

Sumber: (BioMérieux, 2010)

### 3. API 20 E

API 20 E adalah metode pemeriksaan bakteri untuk batang Gram negatif golongan *Enterobacteriaceae* dan non fastidious lainnya. Sebelum membuat suspensi bakteri, terlebih dahulu dilakukan tes oksidase. Hasil tes oksidase akan dimasukkan ke lembar hasil akhir. Inokulum disiapkan dengan membuka ampul media API (NaCl 0,85% 5 mL) atau dapat juga menggunakan 5 mL saline atau *distiled water* steril dalam tabung steril. Isolat bakteri tunggal yang terisolasi dengan baik kemudian diemulsikan ke dalam tabung tersebut dengan menggunakan *PSI*pette atau ose steril. Isolat bakteri diemulsikan secara hati-hati sehingga diperoleh suspensi bakteri yang homogen. Isolat bakteri yang dipakai adalah isolat yang berumur 18-24 jam. Suspensi bakteri ini segera diinokulasikan ke strip API 20 E dengan menggunakan *pipette*. Tes ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S dan URE diisi inokulum bakteri hanya pada *tube* kemudian bagian cupule diisi *mineral*

*oil* untuk menciptakan suasana anaerob. Tes [CIT], [VP] dan [GEL] diisi suspensi bakteri pada *tube* dan *cupule*. Tes yang lain diisi inokulum bakteri hanya pada *tube*. Nampan ditutup dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 18-24 jam.<sup>66</sup> Untuk tes yang membutuhkan reagen tambahan seperti tes TDA, ditambahkan 1 tetes reagen PDA, tes IND ditambahkan 1 tetes reagen James, tes VP ditambahkan 1 tetes reagen VP 1 dan VP 2, kemudian ditunggu selama 10 menit. Interpretasi hasil dimasukkan dalam lembar hasil dan dicocokkan dengan tabel *profile* atau *apiweb software*.

Pada beberapa kasus tujuh digit angka tidak dapat mengidentifikasi bakteri, sehingga diperlukan tes tambahan seperti reduksi nitrat, adanya gas N<sub>2</sub>, *motility* (MOB), *growth on Mc Conkey* (McC), oksidasi glukosa (OF-O), fermentasi glukosa (OF-F). Tes reduksi nitrat menjadi nitrit (NO<sub>2</sub>) dan produksi gas N<sub>2</sub> dilakukan dengan menambahkan reagen NIT 1 dan NIT 2 ke *cupule* glukosa kemudian ditunggu 2-5 menit. Warna merah menunjukkan reaksi nitrit positif sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi negatif. Reduksi menjadi gas N<sub>2</sub> diperiksa dengan menambahkan 2-3 mg reagen Zn ke *cupule* glukosa, setelah 5 menit dan warna tetap kuning menunjukkan reaksi N<sub>2</sub> positif. Warna jingga-merah menunjukkan reaksi N<sub>2</sub> negatif, nitrat masih ada di *cupule* setelah direduksi oleh Zn. Tes *motility* dikerjakan dengan inokulasi bakteri pada media API M, pertumbuhan di media Mc Conkey, media OF-O dan OF-F juga dikerjakan sehingga diperoleh sembilan digit angka.<sup>66</sup>

Tabel 2.15. Tes biokimia pada API 20 E

Test	Komposisi	Reaksi	Hasil	
			Negatif	Positif
<b>ONPG</b>	<i>2 Nitrophenyl βD Galactopyranoside</i>	<i>Ortho Nitrophenyl βD Galactopyranosidase</i>	Tidak berwarna	Kuning
<b>ADH</b>	<i>L-Arginine</i>	<i>Arginine Dihydrolase</i>	Kuning	Merah-orange
<b>LDC</b>	<i>L-Lysin</i>	<i>Lysine Decarboxilase</i>	Kuning	Merah-Orange
<b>ODC</b>	<i>L-Ornithin</i>	<i>Ornithine decarboxilase</i>	Kuning	Merah-Orange
<b>[CIT]</b>	<i>Trinatriumcitrat</i>	<i>Citrate utilization</i>	Hijau-kuning pucat	Hijau kebiruan-biru
<b>H2S</b>	<i>Natriumthiosulfat</i>	Produksi H2S	Tidak berwarna-kehijauan	Deposit hitam
<b>URE</b>	<i>Urea</i>	<i>Urease</i>	Kuning	Merah-orange
<b>IND</b>	<i>L-Tryptophane</i>	Produksi indol	Tidak berwarna-hijau pucat- kuning pucat	Merah muda
<b>[VP]</b>	<i>Natriumpyruvat</i>	Produksi acetoin	Tidak berwarna-merah muda pucat	Merah muda-merah
<b>[Gel]</b>	<i>Gelatin</i>	<i>Gelatinase</i>	Tidak ada difusi	Pigmen hitam
<b>Glu</b>	<i>D-glukosa</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning – kuning kehijauan
<b>Man</b>	<i>D-manitol</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>INO</b>	<i>Inositol</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>SOR</b>	<i>D-sorbitol</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>RHA</b>	<i>L-Rhamnosa</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>SAC</b>	<i>D-sakarosa</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>MEL</b>	<i>D-melibiosa</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>AMY</b>	<i>Amygdalin</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>ARA</b>	<i>L-arabinosa</i>	Fermentasi-oksidasi	Biru-biru kehijauan	Kuning
<b>OX</b>	Tes oksidase (tidak termasuk dalam paket)	<i>Cytochrome-oksidadase</i>		

Sumber: (BioMérieux, 2010)

#### 4. API 20NE

Strip API 20 NE merupakan tes biokimia untuk mengidentifikasi batang Gram negatif *non* enterik dan *non fastidious* seperti *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*. Inokulasi suspensi bakteri dilakukan secara hati-hati dan diusahakan tidak terbentuk gelembung udara. Inokulasi tes NO<sub>3</sub> sampai PNPG dilakukan lebih dulu. Sisa 200 µL suspensi bakteri kemudian dimasukkan ke API AUX Medium dan dihomogenkan. Suspensi yang baru dibuat ini kemudian diinokulasikan ke tes [GLU] sampai [PAC]. Tes ini diisi sampai *cupule* sampai sedikit konveks dan tidak boleh konkaf. Tambahkan *mineral oil* sampai *cupule* pada tes GLU, ADH, dan URE. Strip diinkubasi pada 29°C ± 2°C selama 24 jam.<sup>67</sup>

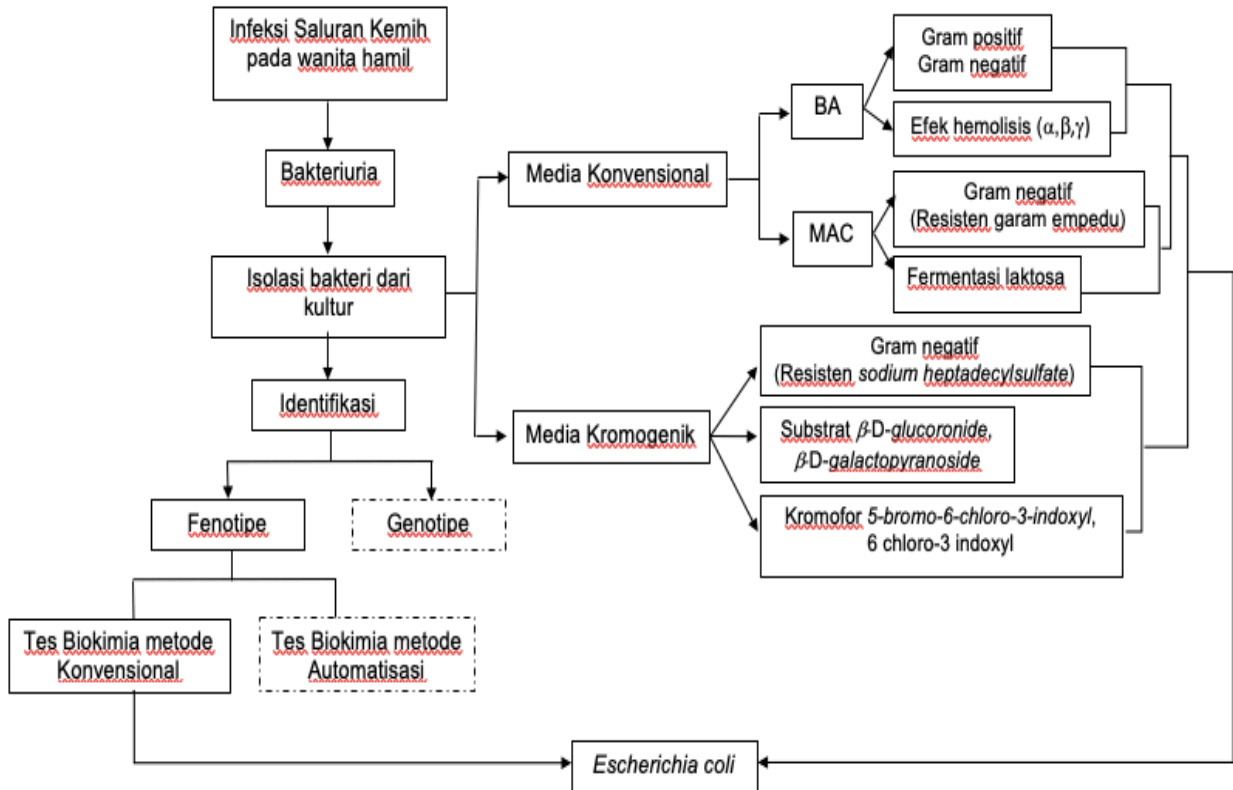


Tabel 2.16. Tes biokimia pada API 20 NE

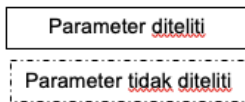
Test	Komposisi	Reaksi	Hasil	
			Negatif	Positif
<b>NO<sub>3</sub></b>	<i>Potassium nitrate</i>	Reduksi nitrat menjadi nitrit	Tak berwarna	Merah muda-merah
		Reduksi nitrat menjadi nitrogen	Merah muda	Tak berwarna
<b>TRP</b>	<i>L tryptophan</i>	Produksi indol	Tak berwarna, pucat kehijauan/kekuningan	Merah muda
<b><u>GLU</u></b>	<i>D glucose</i>	fermentasi	Biru-hijau	Kuning
<b><u>ADH</u></b>	<i>L arginine</i>	Arginine dihydrolase	Kuning	Oranye/merah muda/merah
<b><u>URE</u></b>	<i>Urea</i>	Urease	Kuning	Oranye/merah muda/merah
<b>ESC</b>	<i>Esculine ferric citrate</i>	Hidrolisis esculine	Kuning	Abu-abu/cokelat/ hitam
<b>GEL</b>	<i>Gelatin</i>	Hidrolisis gelatin	Tanpa pigmen	Pigmen hitam
<b>PNPG</b>	<i>4-nitrophenyl βD galactopyranoside</i>	β galactosidase	Tak berwarna	Kuning
<b><u>[GLU]</u></b>	<i>D glucose</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[ARA]</u></b>	<i>Larabinose</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[MNE]</u></b>	<i>D mannose</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[MAN]</u></b>	<i>D mannitol</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[NAG]</u></b>	<i>N acethyl glucosamine</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[MAL]</u></b>	<i>D maltose</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[GNT]</u></b>	<i>Potassium gluconate</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[CAP]</u></b>	<i>Capric acid</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[ADI]</u></b>	<i>Adiptic acid</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[MLT]</u></b>	<i>Malic acid</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[CIT]</u></b>	<i>Trisodium citrate</i>	asimilasi	Transparan	Opaq
<b><u>[PAC]</u></b>	<i>Phenylacetic acid</i>	asimilasi	Transparan	Opaq

Sumber: (BioMérieux, 2010)

## 2.7 Kerangka Teori

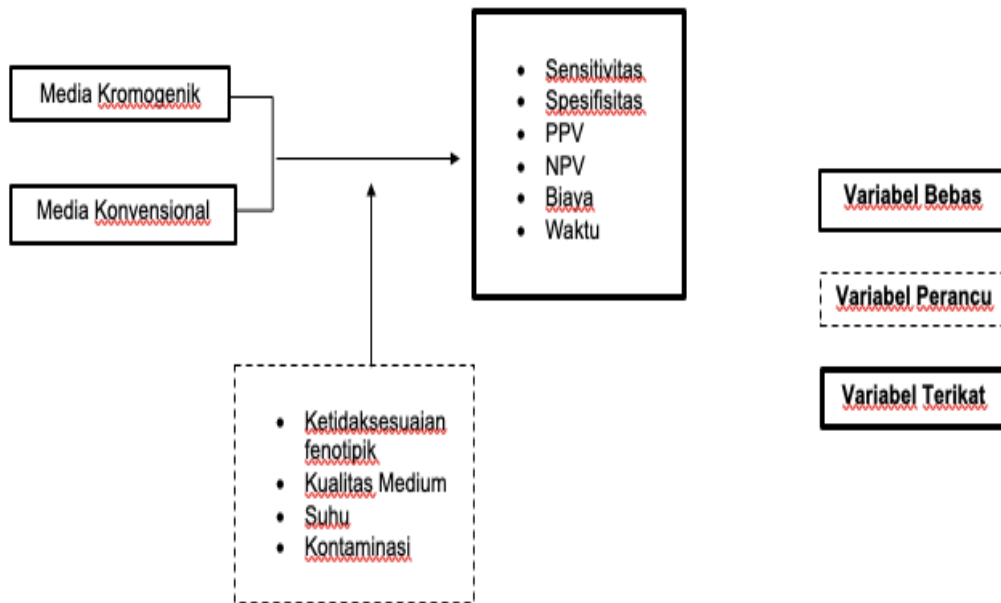


**Keterangan :**



Gambar 2.17. Kerangka Teori

## 2.8 Kerangka Konsep



Gambar 2.18. Kerangka Konsep