



PENDIDIKAN BERKESINAMBUNGAN PATOLOGI KLINIK 2018

SIMPOSIUM TEKNIS LABORATORIUM II PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI



**PENDIDIKAN
BERKESINAMBUNGAN
PATOLOGI KLINIK 2018**

**SIMPOSIUM TEKNIS LABORATORIUM II
PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI**

Editor:

Ina S Timan
Dewi Wulandari

PENDIDIKAN BERKESINAMBUNGAN PATOLOGI KLINIK 2018
SIMPOSIUM TEKNIS LABORATORIUM II
PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI

Editor:

Ina S Timan
Dewi Wulandari

Penasehat:

Prof. dr Marzuki Suryaatmadja, SpPK(K)
Prof. Dr. dr. Rustadi Sosrosuhardjo, DMM, MS, SpPK(K)
Prof. dr. Riadi Wirawan, SpPK(K)
Prof. dr. Rahajuningsih D. Setiabudy, SpPK(K), DSc
Prof. Dr. dr. Ida Parwati, SpPK(K), PhD
dr. Alida R. Harahap, SpPK(K), PhD
dr. Farida Oesman, SpPK(K)
dr. Dalima A.W. Astrawinata, SpPK(K), M.Epid

Ketua:

dr. Yusra, SpPK, PhD

Wakil Ketua:

dr. Astuti Giantini, SpPK, MPH

Sekretaris:

dr. July Kumalawati, DMM, SpPK(K)
dr. Ro Shinta Christina Solin, SpPK

Bendahara:

dr. Sri Suryo Adiyanti, M.Kes, SpPK
dr. Dean Handimulya, SpPK

Sie Ilmiah:

Dr. dr. Ina Susianti Timan, SpPK(K), MARS
dr. Dewi Wulandari, SpPK, MSc

Sie Dana:

dr. Fify Henrika, SpPK(K)
dr. Ninik Sukartini, DMM, SpPK(K)

Sie Acara:

dr. Astuti Giantini, SpPK, MPH

Sie Konsumsi:

Dr. dr. Diana Aulia, SpPK(K)
Dr. dr. Merci Monica, SpPK

Sie Publikasi, Dokumentasi dan Buku:

dr. Nuri Dyah Indrasari, SpPK(K)
dr. Yusuf Bahasoan, SpPK

Sie Akomodasi dan Transportasi:

Prof. dr. Suzanna Immanuel, SpPK(K)
Dr. dr. Tonny Loho, DMM, SpPK(K)

21 cm x 29,7 cm
ix+ 23 Halaman

ISBN 978-602-5532-10-8



Desain sampul dan Tata letak

Hari

Diterbitkan pertama kali oleh

PIPInterna

Perkumpulan Informasi dan Penerbitan Interna
Gedung Cimandiri One, Lantai 3, Unit 302
Jl. Cimandiri No:1 - Cikini, Jakarta Pusat 10330,
Tlp: 021-31903775. Email: pipfkui@yahoo.com

Agustus2018

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan bentuk apapun tanpa seizin penulis dan penerbit

SAMBUTAN KETUA UMUM PERHIMPUNAN DOKTER SPESIALIS PATOLOGI KLINIK DAN KEDOKTERAN LABORATORIUM

Assalamualaikum wrwb,
Salam Sejahtera,
Sejawat yang terhormat,

Puji syukur kami ucapkan kepada Yang Maha Esa, karena kita bertemu lagi pada Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik (PBPK) telah terselenggara untuk kali ke XVII. Penghargaan setinggi tingginya kami sampaikan untuk para penggagas dan Departemen Patologi Klinik FKUI/RSCM yang secara konsisten menjaga kesinambungan acara ini.

Kegiatan PBPK ke XVII kali ini membahas kemajuan terkini semua aspek laboratorium medik dengan tema yang sangat luas; "Diagnosis Laboratorium Penyakit Anak dan Dewasa". Tema yang secara khusus membagi diagnosis laboratorium untuk kelompok penyakit anak dan dewasa menjadi penting, karena pengelolaannya yang berbeda, untuk menuju ke presisi yang lebih baik.

Namun demikian, saat ini ketika banyak dirupsi di bidang laboratorium, kemajuan teknologi harus dimaknai ulang dengan upaya efisiensi. Karena tanpa efisiensi, laboratorium yang sejak dulu menjadi 'revenue center' akan menjadi 'cost center'. Kewajiban kita semua untuk melakukan efisiensi, tanpa mengurangi standar pelayanan terhadap pasien kita.

Akhir kata, Terimakasih kepada panitia, para Guru Besar, narasumber dan para mitra kerja yang telah mendukung terselenggaranya PBPK ke XVII ini.

Selamat mengikuti, Selamat menikmati, semoga bermanfaat.

Jakarta, Agustus 2018

Ketua Umum Pengurus Pusat

Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia,



Prof. Dr. Ida Parwati, dr.,SpPK(K) PhD.

DAFTAR KONTRIBUTOR TULISAN

dr. Dean Handimulya Djumaryo, SpPK

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia &
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

dr. July Kumalawati, DMM, SpPK(K)

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia &
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

Dr. dr. Tonny Loho, DMM, SpPK(K)

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia &
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

DAFTAR ISI

kata Pengantar Ketua Panitia	iii
Sambutan Ketua Umum Perhimpunan	v
Daftar Kontributor	vii
Daftar Isi	ix
Pengumpulan Spesimen untuk Pemeriksaan Mikrobiologi Klinik.....	1
Dean Handimulya Djumaryo	
Pemeriksaan Laboratorium Difteria.....	14
July Kumalawati	
Faktor Yang Mempengaruhi Tes Resistensi Antibiotik.....	18
Tonny Loho	

FAKTOR YANG MEMPENGARUHI TES RESISTENSI ANTIBIOTIK

Tonny Loho

Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM

ABSTRAK

Metode tes resistensi antibiotik dibagi menjadi metode tes berdasarkan pengenceran dan berdasarkan difusi. Metode tes resistensi berdasarkan difusi terdiri atas difusi cakram (*disc diffusion*) dan difusi berjenjang (*gradient diffusion/epsilometry*). Metode difusi cakram adalah metode uji kepekaan antimikroba yang banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi. Metode difusi cakram telah distandardisasi terutama untuk menguji bakteri yang cepat tumbuh. Untuk bakteri yang sulit tumbuh dan anaerob, metode harus dimodifikasi khusus. Metode difusi cakram dipengaruhi oleh banyak faktor seperti cakram antimikroba, medium agar, prosedur inokulasi, suhu inkubasi, lama inkubasi, dan pembacaan hasil. Untuk pemantapan mutu digunakan kuman kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Juga dengan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dan *Escherichia coli* ATCC 35218.

Kata kunci: tes resistensi, difusi cakram, faktor yang mempengaruhi

PENDAHULUAN

Tes resistensi antibiotik adalah tes yang dilakukan untuk mengetahui antimikroba yang masih sensitif terhadap mikroba yang ditemukan pada spesimen klinik. Tes ini sangat diperlukan pada penanganan penyakit infeksi sehingga menjadi bagian yang sangat penting di pemeriksaan laboratorium mikrobiologi. Bagi klinisi yang berpandangan pragmatis, hasil tes resistensi antibiotik dianggap lebih penting dari pada identifikasi bakteri penyebab infeksi. Hal ini terutama relevan pada masa di mana resistensi antibiotik amat meningkat. Akibatnya laboratorium harus memberi prioritas yang tinggi untuk menghasilkan data yang akurat. Tujuan utama tes resistensi antibiotik adalah memprediksi hasil pengobatan dengan antibiotik yang diuji. Implikasi hasil 'sensitif' adalah kemungkinan besar pasien akan memberi respon yang baik dengan dosis antibiotik yang tepat. Hasil 'resisten' menunjukkan bahwa kemungkinan besar hasil terapi dengan antibiotik tersebut akan gagal. Hasil 'intermediet'

menunjukkan kemungkinan antibiotik akan berhasil apabila diberikan dalam dosis yang lebih tinggi sepanjang dosis tersebut masih berada dalam level aman.¹

Untuk dapat melakukan tes resistensi antibiotik dengan benar diperlukan pengetahuan dasar yang memadai tentang berbagai faktor yang memengaruhi tes tersebut. Pada makalah ini akan dibahas tentang klasifikasi metode tes resistensi, metode difusi cakram, dan faktor-faktor yang berpengaruh.

KLASIFIKASI METODE TES RESISTENSI

Metode tes resistensi antibiotik dibagi menjadi metode tes yang berdasarkan pengenceran dan berdasarkan difusi. Metode tes resistensi yang berdasarkan pengenceran terdiri atas metode pengenceran media padat/agar (*agar dilution*) dan metode pengenceran media cair (*broth dilution*). Metode pengenceran media cair (*broth dilution*) terbagi menjadi metode pengenceran menggunakan tabung (*macro broth dilution*) dan metode menggunakan sumur kecil (*micro broth dilution*). Metode tes resistensi yang berdasarkan difusi dibagi menjadi difusi cakram (*disc diffusion*) dan difusi berjenjang (*gradient diffusion/epsilometry*).¹

Metode difusi cakram (*disc diffusion*)

Metode difusi cakram adalah metode uji kepekaan antimikroba yang banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi. Metode difusi cakram telah distandardisasi terutama untuk menguji bakteri yang cepat tumbuh. Untuk bakteri yang sulit tumbuh dan anaerob, metode harus dimodifikasi khusus. Diameter zona inhibisi dipengaruhi oleh kecepatan difusi antimikroba melalui agar; yang berbeda pada masing-masing antimikroba, tergantung pada ukuran molekul dan kapasitas hidrofilitiknya.¹

Cakram antimikroba

Jumlah antimikroba pada setiap cakram antimikroba telah ditentukan ketika antimikroba tersebut dikembangkan oleh pabriknya. Cakram antimikroba harus disimpan pada suhu 2 - 8°C atau dibekukan pada suhu -20 °C, atau lebih dingin pada *non-frost-free freezer*. Cakram yang mengandung antimikroba beta laktam harus disimpan dalam keadaan beku untuk menjamin kualitas potensi antimikroba, walaupun sejumlah kecil cakram dapat disimpan dalam lemari pendingin (*refrigerator*) untuk stok selama 1 minggu. Wadah cakram antimikroba yang belum dibuka, harus dikeluarkan dari *refrigerator* atau *freezer* selama 1 – 2 jam sebelum digunakan. Hal ini bertujuan agar suhu cakram antimikroba sesuai dengan suhu kamar sebelum wadahnya dibuka, sehingga meminimalisasi kondensasi yang dapat terjadi ketika udara hangat bersentuhan dengan cakram yang dingin.¹

Medium agar

Medium agar yang direkomendasikan untuk uji difusi cakram adalah agar Muller Hinton (MH). Agar MH yang dipilih karena: memiliki reproduibilitas yang baik antar *batch* untuk

uji kepekaan antimikroba; mengandung inhibitor sulfonamid, trimetoprim dan tetrasiklin dalam kadar rendah; mendukung pertumbuhan sebagian besar bakteri yang tumbuh cepat; dan pengalaman penggunaan bertahun-tahun menunjukkan data yang baik. Bakteri yang sulit tumbuh seperti *Hemophilus sp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* dan *Streptococcus*, memerlukan suplemen atau modifikasi tertentu agar dapat tumbuh dengan baik pada media MH.^{1,2}

Media MH dapat diperoleh secara komersial dari pabrik. Setelah diautoklav, media diletakkan dalam penangas air 45 - 50°C, dituang ke dalam cawan Petri yang memiliki dasar datar dengan ketebalan 4 mm. Ketebalan agar yang melebihi 4 mm dapat menyebabkan hasil resisten palsu (zona hambatan lebih kecil dari yang seharusnya). Ketebalan agar yang kurang dari 4 mm dapat menyebabkan hasil sensitif palsu (zona hambatan lebih besar dari yang seharusnya).¹

Setiap *batch* MH harus diperiksa pH-nya untuk memastikan pH berada dalam rentang 7,2 - 7,4. Bila pH <7,2, antimikroba seperti aminoglikosida, makrolida dan fluorokuinolon akan menurunkan daya bunuh bakterinya. Pada pH <7,2, penisilin dan tetrasiklin akan bertambah daya bunuh bakterinya. Pada pH >7,4, daya bunuh bakteri aminoglikosida, makrolida dan fluorokuinolon akan meningkat, sebaliknya daya bunuh penisilin dan tetrasiklin akan menurun.^{1,2}

Sebelum digunakan, permukaan agar MH perlu diperhatikan. Bila didapatkan kelembaban yang berlebihan, kelembaban harus dihilangkan dengan memasukkan agar ke dalam inkubator 35°C dengan tutup sedikit terbuka dan posisi plat agar terbalik, sampai kelembaban hilang. Pada saat medium MH akan diinokulasi, tidak boleh ada kelembaban pada permukaan agar atau tutup cawan Petri.¹

PROSEDUR INOKULASI

Inokulasi harus dilakukan menggunakan inokulum yang sudah distandardisasi pada 0,5 McFarland. Inokulum dapat dipersiapkan dengan metode pertumbuhan (*growth method*) atau metode suspensi langsung (*direct suspension*). Pada metode pertumbuhan, 4 atau 5 koloni bakteri yang tumbuh *over night* (18 - 24 jam inkubasi) diinokulasikan pada media cair yang mendukung pertumbuhan yang baik (seperti *tryptic soy broth*). Media cair diinkubasi pada 35°C hingga mengalami kekeruhan, kemudian suspensi diencerkan hingga mencapai 0,5 McFarland Barium Sulfat ($BaSO_4$) atau kekeruhan partikel lateks standar, kira-kira setara dengan 10^8 CFU (*colony forming unit*)/mL. Standard 0,5 McFarland dapat dibeli komersial atau dibuat sendiri menurut petunjuk CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Ketepatan standard 0,5 McFarland harus diverifikasi dengan menggunakan spektrofotometer dengan jalur cahaya 1 cm; untuk standard 0,5 McFarland, absorbansi pada panjang gelombang 625 nm harus berkisar antara 0,08 - 0,13.¹

Pada metode suspensi langsung, metode yang banyak digunakan di laboratorium adalah mengambil 5 atau lebih koloni yang tumbuh dalam waktu semalam pada agar non-selektif,

lalu dibuat suspensi yang kekeruhannya setara dengan 0,5 McFarland. Dengan cara ini, tidak perlu membuang waktu menunggu pertumbuhan bakteri pada media cair. Suspensi dibuat dengan menggunakan NaCl fisiologis atau media cair steril.^{1,2}

Setelah suspensi inokulum dipersiapkan, inokulasi harus dilakukan dalam waktu 15 menit karena penundaan yang lebih lama akan menyebabkan perubahan pada jumlah bakteri dalam suspensi.¹

Cakram antimikroba

Dalam waktu 15 menit setelah agar MH diinokulasi dengan suspensi bakteri maka cakram antimikroba harus diletakkan di permukaan agar MH. Jarak yang ideal antara 2 pusat cakram antimikroba adalah 24 mm. Cakram antimikroba diletakkan satu per satu dengan menggunakan forsep steril. Sebaiknya untuk plat berdiameter 10 cm, hanya diletakkan maksimum 5 cakram dan untuk plat berdiameter 15 cm, hanya diletakkan maksimum 12 cakram. Setelah menyentuh permukaan agar MH, antimikroba akan segera berdifusi sehingga bila terjadi salah peletakkan cakram, letak cakram tidak boleh dipindah.¹

Inkubasi

Maksimum 15 menit setelah cakram diletakkan, plat agar MH harus diletakkan terbalik dan diinkubasi pada 35°C, udara biasa. Keterlambatan inkubasi lebih dari 15 menit akan menyebabkan antimikroba akan mengalami predifusi yang berlebihan sehingga berpotensi mengubah interpretasi hasil.¹

INTERPRETASI DAN PELAPORAN HASIL

Plat agar MH dinilai setelah inkubasi 16 – 18 jam untuk bakteri yang mudah tumbuh, kecuali untuk *Staphylococcus* dan *Enterococcus*, yang harus diinkubasi selama 24 jam penuh supaya dapat dinilai resistensi terhadap *oxacillin* dan *vancomycin*. Bila plat MH diinokulasi dengan benar maka akan didapatkan diameter zona inhibisi yang bundar dan pertumbuhan bakteri yang *confluent*. Pertumbuhan koloni yang masih memperlihatkan pertumbuhan koloni individual, menyatakan inokulum terlalu encer sehingga uji kepekaan antimikroba harus diulang.

Diameter zona hambatan diukur dengan menggunakan *caliper* atau penggaris. Pada agar MH tanpa suplementasi, pembacaan zona inhibisi dilakukan dengan membalikkan plat agar MH dengan sinar lampu dibelakangnya dan diukur pada bagian dasar plat MH.^{1,2} Batas zona inhibisi adalah area dimana tidak ada pertumbuhan bakteri.

Pada *Staphylococcus* dan *Enterococcus*, setiap pertumbuhan yang dapat terlihat (terutama koloni yang kabur atau kecil sekali) di dalam zona inhibisi di sekitar cakram *oxacillin* (untuk *Staphylococcus*) atau cakram *vancomycin* (untuk *Enterococcus*) merupakan petunjuk adanya resistensi.¹

Untuk bakteri yang lain, adanya koloni yang tumbuh di area zona inhibisi, menunjukkan kemungkinan: 1) biakan yang tidak murni (tercampur dengan bakteri yang lain), sehingga harus dilakukan subkultur, identifikasi ulang dan uji kepekaan ulang, 2) adanya seleksi bakteri mutan yang resisten terhadap antimikroba yang diuji.¹

Pada *Proteus* sp, bila ditemukan lapisan tipis pertumbuhan bakteri yang tumbuh di dalam zona inhibisi maka batas zona inhibisi yang diukur adalah batas adanya pertumbuhan bakteri yang banyak. Pertumbuhan bakteri yang tipis seperti film tidak dianggap.¹

Pada uji trimetoprim, sulfonamid, dan kombinasi keduanya, antagonis yang terdapat dalam media MH dapat menimbulkan pertumbuhan yang sedikit sekali/minimal sehingga zona inhibisi yang diukur adalah pada batas yang tegas. Pertumbuhan yang sedikit (20% atau kurang) tidak diperhitungkan.¹

Diameter zona inhibisi diinterpretasi sesuai dengan petunjuk yang dikeluarkan oleh CLSI dan dilaporkan sebagai sensitif, intermediet atau resisten.²

PEMANTAPAN MUTU

Kuman kontrol

Untuk meyakinkan hasil uji kepekaan antimikroba maka perlu dilakukan pemantapan mutu dengan menggunakan kuman kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.^{1,2} Juga dengan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dan *Escherichia coli* ATCC 35218. *Escherichia coli* ATCC 35218 direkomendasikan untuk menguji kombinasi inhibitor beta laktamase seperti *clavulanic acid*, sulbaktam, dan tazobaktam.¹ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 digunakan untuk menguji jumlah inhibitor dalam media MH dan cakram yang mengandung konsentrasi tinggi gentamisin atau streptomisin.¹

Rentang diameter zona inhibisi

Rentang diameter zona inhibisi untuk galur bakteri referensi mengalami pembaruan dari waktu ke waktu; yang dikeluarkan oleh CLSI.²

RINGKASAN

Metode tes resistensi antibiotik dibagi menjadi metode tes yang berdasarkan pengenceran dan berdasarkan difusi. Metode tes resistensi yang berdasarkan difusi dibagi menjadi difusi cakram (*disc diffusion*) dan difusi berjenjang (*gradient diffusion/epsilometry*). Metode difusi cakram adalah metode uji kepekaan antimikroba yang banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi. Metode difusi cakram telah distandardisasi terutama untuk menguji bakteri yang cepat tumbuh. Untuk bakteri yang sulit tumbuh dan anaerob, metode harus dimodifikasi khusus. Metode difusi cakram dipengaruhi oleh cakram antimikroba, medium agar, prosedur inokulasi, suhu inkubasi, lama inkubasi, dan pembacaan hasil.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, et al, editors. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC: ASM Press; 2015. p. 1253-73.
2. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.