

Peran Media untuk Identifikasi Mikroba Patogen

Usman Suwandi

Penelitian dan Pengembangan, PT Kalbe Farma, Jakarta

PENDAHULUAN

Sediaan obat tertentu seperti tablet, sirup, kapsul atau krim tidak perlu dibuat steril, namun mikroba tertentu atau dalam jumlah besar dapat menyebabkan infeksi berat atau fatal. Oleh karena itu walaupun tidak dibuat steril, kontaminan sediaan tersebut harus dibatasi jumlahnya. Untuk membatasi jumlah mikroba perlu dilakukan berbagai cara seperti pemeliharaan ruang proses, peralatan, penyimpanan bahan maupun penambahan zat pengawet.

Selain pembatasan jumlah mikroba, masing-masing sediaan juga harus bebas dari kuman tertentu, terutama yang patogenik. Namun demikian antara farmakope satu dengan yang lain sedikit ada perbedaan dalam membatasi jumlah dan jenis patogenik yang diuji. Sebagai contoh diambil dari USP-23 dan European Pharmacopeia. Secara umum syarat jumlah mikroba pada European Pharmacopeia pada berbagai jenis sediaan terlihat lebih jelas dan tegas dibandingkan USP (**Tabel 1** dan **Tabel 2**).

Untuk menetapkan bahwa suatu kontaminan merupakan salah satu mikroba tersebut, mereka harus ditumbuhkan/dibiakkan terlebih dahulu. Kemudian koloni yang terbentuk ditumbuhkan pada media spesifik. Hanya mikroba tertentu yang dapat tumbuh pada media tersebut dengan bentuk dan warna spesifik. Makin sedikit jenis mikroba yang dapat tumbuh, maka makin baik media tersebut untuk menetapkan dan memilah jenis mikroba tertentu. Makin banyak mikroba yang dapat tumbuh, maka semakin sulit untuk memilah dan menetapkan jenis kontaminan tersebut. Di samping menggunakan media khusus, konfirmasi jenis mikroba dapat menggunakan berbagai pewarnaan, reaksi enzimatis atau reaksi biokimia, terutama jika identifikasi menggunakan media masih meragukan/belum memuaskan. Tulisan ini akan mengulas dasar pemikiran menggunakan media tertentu untuk menetapkan dan memilah jenis mikroorganisme tertentu.

Seperti telah disebutkan bahwa masalah utama dalam menggunakan media adalah spesifisitas media terhadap mik-

Tabel 1. Pengujian mikrobiologi menurut USP-23, 1995

1.	Sediaan suspensi untuk oral :	• Eschericia coli
2.	Sediaan untuk topikal :	• Staphylococcus aureus • Pseudomonas aeruginosa
3.	Bahan yang berasal dari alam :	• Jamur dan ragi • Eschericia coli
4.	Sediaan uretral dan vaginal :	• Jamur dan ragi

Tabel 2. Pengujian mikrobiologi menurut European Pharmacopeia 1997

1.	Sediaan untuk topikal dan saluran pernafasan :	
•	Angka mikroba	< 100 cfu/gr atau ml
•	Jamur	< 100 cfu/gr atau ml
•	Enterobakteria	< 10 cfu/gr atau ml
•	Bakteri gram negatif lain	< cfu/gr atau ml
•	Pseudomonas aeruginosa	= negatif/gr
•	Staphylococcus aureus	= negatif/gr
2.	Sediaan untuk oral dan rektal :	
•	Angka mikroba	< 1000 cfu/gr
•	Jamur	< 100 cfu/gr
•	Escheacia coli	= negatif/gr
3.	Sediaan menggunakan bahan baku dari alam :	
•	Angka mikroba	< 1000 cfu/gr
•	Jamur	< 100 cfu/gr
•	Bakteri gram negatif	< 100 cfu/gr
•	Enterobakter	< 100 cfu/gr
•	Salmonella	= negatif/10 g
•	Eschericia coli	= negatif/g
•	Staphylococcus aureus	= negatif/g

roba tertentu. Sebagai contoh, media yang digunakan untuk identifikasi dan memilah *Salmonella*. Dengan menggunakan media tersebut diharapkan hanya *Salmonella* yang tumbuh, ternyata kuman lain juga dapat tumbuh; dengan demikian akan menyebabkan kesalahan dalam menetapkan jenis mikroba tersebut. Oleh karena itu, untuk memastikan jenisnya, perlu kon-

firiasi dengan media spesifik lainnya atau dengan cara reaksi biokimia lainnya.

MEDIA UNTUK ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROBA PATOGEN

Bila mempelajari berbagai farmakope seperti Farmakope Indonesia - IV 1995; USP-23 1995; European Pharmacopeia 1997 dan British Pharmacopeia -1993, jenis mikroorganisme patogenik yang harus dibatasi jumlah dan jenisnya yaitu *Eschericia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Untuk menetapkan bahwa suatu kontaminan merupakan salah satu dari mikroorganisme tersebut, farmakope menunjukkan berbagai macam media yang dapat dipergunakan. **Gambar 1**, merupakan contoh jenis media dan karakteristik koloni yang terbentuk seperti dianjurkan oleh FI-IV. Dalam kenyataannya, menggunakan beberapa jenis media sekaligus memerlukan banyak waktu dan biaya, karena itu menggunakan satu jenis media yang paling selektif dan spesifik akan sangat membantu dan lebih efisien. Untuk dapat memilih dengan tepat media yang digunakan diperlukan pengetahuan mengenai komposisi media dan peranan setiap komponen serta karakteristik mikroorganisme tertentu.

Gambar 1. Media dan morfologi mikroorganisme

Mikroorganisme	Jenis Media	Karakteristik
1. Staphylococcus aureus	Mannitol salt agar (MSA)	Kuning dengan zona kuning
	Vogel Johnson Agar (VGA)	Hitam dikelilingi zona kuning
	Baird Parker Agar (BPA)	Hitam berkilau di kelilingi zona jernih
2. Pseudomonas aeruginosa	Cetrimide Agar Medium (CAM)	Kehijauan
	Pseudomonas Agar Medium-deteksi fluoresin (PAM-p)	Kekuningan
3. Salmonella sp.	Bismuth Sulfite Agar (BSA)	Hitam atau hijau
	Briliant Green Agar (BGA)	Kecil, transparan, tidak berwarna atau merah muda hingga buram, dikelilingi zona merah muda
	Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium (XLD)	Merah, dengan atau tanpa pusat berwarna hitam
4. Eschericia coli	L. Eosin Methylene Blue (L. EMB)	Koloni hitam dengan kilap logam
	MacConkey Agar (MCA)	Merah bata, dikelilingi endapan empedu

A. PENGUJIAN E. COLI

E. coli merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, uji indole positif dan mampu memfermentasi berbagai karbohidrat seperti glukosa, laktosa, manitol dan arabinosa.

Media Eosin Methylene Blue mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilih mikroba yang memfermentasi laktosa seperti *E. coli* dengan mikroba yang tidak memfermentasikan laktosa seperti *S. aureus*; *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Mikroba yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam, sedangkan mikroba lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Adanya eosin dan methylene blue membantu mempertajam perbedaan tersebut. Namun demikian

jika media ini digunakan pada tahap awal, karena kuman lain juga tumbuh terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella sp* dapat menimbulkan keraguan. Bagaimanapun media ini sangat baik untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah *E. coli*.

Media MacConkey Agar mempunyai keistimewaan memilah bakteri enterik gram negatif yang memfermentasi laktosa, karena media ini mengandung laktosa, *crystal violet* dan *neutral red bile salt*. Kemampuan *E. coli* memfermentasi laktosa menyebabkan penurunan pH, sehingga mempermudah absorpsi *neutral red* untuk mengubah koloni menjadi merah bata dan *bile/ empedu* diendapkan. Koloni lain (*S. aureus*; *P. aeruginosa* dan *Salmonella*), bila tumbuh tidak akan berwarna karena tidak mampu memfermentasi laktosa. Mikroba lain yang dapat tumbuh pada media ini antara lain *Enterobacter*; *Proteus*; *Salmonella*; *Shigella*, *Aerobacter*; *Enterococcus*.

Media MacConkey Broth, walaupun tidak tercantum di FI-IV, sebenarnya media ini bermanfaat sekali dalam memilah *E. coli* dari mikroba lain terutama *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Adanya Oxgall dalam media berperan dalam menghambat bakteri gram positif lain seperti *S. aureus*. Kandungan laktosa sangat penting untuk memilah *E. coli* dari mikroba lain yang tidak memfermentasi laktosa, terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Fermentasi laktosa oleh *E. coli* menyebabkan pH turun. Kondisi asam akan menyebabkan *bromo cresol purple* (media berwarna ungu) berubah menjadi kuning (media berwarna kuning) dan adanya pembentukan gas yang dapat diamati pada tabung durham. Sedangkan *Salmonella* dan *P. aeruginosa* tidak dapat mengubah warna media karena tidak memfermentasi laktosa, sedangkan mikroba lain yang mampu memfermentasi laktosa dan mempunyai ekspresi pada media seperti *E. coli* adalah *Enterobacter aerogenes*. Adapun cara memilah *E. aerogenes* antara lain dengan reaksi indole. *E. coli* mempunyai reaksi positif, sedang *E. aerogenes* bereaksi negatif. Dengan sifat tersebut media ini sangat baik untuk memilah *E. coli* dari mikroba lain pada tahap awal terutama *P. aeruginosa*; *S. aureus* dan *Salmonella*.

B. PENGUJIAN SALMONELLA SP

Bakteri *Salmonella* mempunyai karakteristik gram negatif; berbentuk batang, tidak membentuk spora, aerob/fakultatif anaerob. Ia dapat memfermentasi glukosa dengan membentuk asam/gas dan dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit. Mempunyai sifat katalase positif dan oksidase negatif serta mudah tumbuh pada kebanyakan media.

Bismuth Sulfite Agar merupakan media yang sangat spesifik untuk isolasi *Salmonella typhi* dan spesies lain. Adanya *bismuth sulfite* dan *brilliant green* dapat menghambat pertumbuhan gram positif dan coliform. Adanya S dalam media akan diubah menjadi H₂S yang berperan mengendapkan besi, sehingga koloni berwarna coklat-hitam dengan kilap logam, tampak seperti mata kelinci. Mikroba lain yang dapat tumbuh antara lain *Pseudomonas*, *Shigella* dan *Vibrionaceae*. Media ini sangat baik digunakan pada tahap awal untuk memilahkan *Salmonella* dari mikroba lain. Sedangkan mikroba lain yang tumbuh terutama *Pseudomonas* dapat dipilah dengan media lain.

Brilian green Agar mengandung brilian green yang sangat baik untuk menghambat *E. coli* dan bakteri yang memfermentasi sukrosa dan laktosa. Garam empedu berperan menghambat bakteri untuk batang gram negatif. Media ini sangat selektif untuk isolasi *Salmonella sp. Salmonella typhi* akan berwarna merah dikelilingi zona merah. *Pseudomonas* dihambat, tetapi jika tumbuh menyerupai koloni *Salmonella* berwarna merah. Untuk menetapkan kontaminan tersebut *Salmonella* atau *Pseudomonas* diperlukan konfirmasi dengan media lain.

Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar medium digunakan untuk isolasi *Salmonella* dan memilah organisme lain dengan cara memfermentasi xylose, dekarboksilasi lysine dan produksi H₂S. Fermentasi xylose sangat lazim bagi kebanyakan organisme enterik kecuali, *Shigella*, *Providencia*, *Edwardsiella*. Pada media ini, *Salmonella* akan membentuk koloni merah dengan inti hitam, sedang *Pseudomonas* dapat tumbuh dengan warna merah dan *Escherichia* berwarna kuning. Mikroba lain yang dapat tumbuh pada media ini antara lain *Arizona*, *Proteus*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*. Begitu banyak mikroba yang dapat tumbuh, sehingga media ini kurang dapat memilah *Salmonella* pada tahap awal. Lebih baik digunakan untuk tahap konfirmasi kontaminan *Salmonella*.

Triple Sugar Iron Agar medium, biasanya digunakan untuk konfirmasi pengujian *E. coli* dan dapat digunakan untuk identifikasi bakteri gram negatif yang memfermentasi dekstrosa/laktosa/sukrosa dan produksi H₂S. Dari fungsi tersebut media ini dapat diusulkan untuk konfirmasi *Salmonella* dan memilahkan dari *Pseudomonas* yang tumbuh pada media lain BSA dan BGA. Terjadinya fermentasi dekstrosa oleh *Salmonella* akan menurunkan pH menjadi asam. Kondisi ini akan menyebabkan perubahan *phenol red* (media merah) menjadi kuning. Sedangkan *Pseudomonas* karena tidak mampu memfermentasi dekstrosa, maka media akan tetap berwarna merah. Dengan demikian media ini dapat dengan mudah memilah *Salmonella* dari *Pseudomonas*.

C. PENGUJIAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mannitol Salt Agar Medium mempunyai kandungan garam cukup tinggi, sehingga mikroba lain terutama *P. aeruginosa*; *E. coli*; *Salmonella* akan dihambat pertumbuhannya. *S. aureus* cukup tahan terhadap garam tinggi, sehingga dapat tumbuh dengan warna kuning keemasan dan mediapun berubah menjadi kuning. Dengan demikian media ini sudah sangat selektif dan mampu memilah *S. aureus* dari mikroba lain terutama ketiga mikroba tersebut. Namun demikian ada juga mikroba lain yang dapat tumbuh pada media tersebut seperti jenis *Staphylococcus* lain dan beberapa mikroba *halophili marine*.

Vogel Johnson Agar Medium mengandung mannitol, tellurite dan lithium chloride yang berperan untuk mengisolasi bakteri yang bersifat koagulase positif, karena semua yang bersifat koagulase positif akan tumbuh pada media ini. *S. aureus* mempunyai koloni hitam sebagai akibat pengendapan hasil reduksi tellurite. Media di sekitar koloni akan berubah menjadi kuning akibat fermentasi mannitol. Adanya lithium chloride: sangat bermanfaat untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain

termasuk *E. coli*. Namun demikian media ini kurang mampu memilah *S. aureus* karena semua koagulase positif dapat tumbuh termasuk *S. epidermidis* dan *Proteus*.

Baird Parker Agar Medium juga mengandung lithium untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain dan mikroba bersifat koagulase positif akan tumbuh. *S. aureus* mempunyai koloni spesifik berwarna hitam akibat endapan hasil telurite dan media disekitarnya menjadi jernih. Jenis mikroba yang dapat tumbuh antara lain *Bacillus*, *Proteus* dan *yeast*.

D. PENGURAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa mempunyai karakteristik berbentuk batang, gram negatif, tidak mampu memfermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain, aerob, katalase positif, oksidase positif dan tidak berspora. Ia dapat tumbuh di air suling dan akan tumbuh dengan baik dengan adanya unsur Nitrogen dan Carbon. Mereka banyak dijumpai melimpah dalam air dan tanah.

Cetrimide Agar Medium biasanya digunakan untuk isolasi *Pseudomonas*. Kandungan cetrimide yang merupakan quarternary ammonium merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, karena menyebabkan kebocoran unsur-unsur didalam sel, namun tidak terjadi pada *Pseudomonas*. Pada media cetrimide konvensional beberapa bakteri dapat tumbuh seperti *Klebsiella*, *Proteus* dan *Providencia*. Untuk menghambat pertumbuhan mereka dapat ditambahkan cetrimide. Pada media ini, *P. aeruginosa* dapat dibantu dengan menggunakan media *Pseudomonas Selective Medium* yang mengandung *Nalidixi acid* untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain.

PENUTUP

Dari uraian tersebut dapat dimengerti bahwa tidak ada media tunggal yang hanya ditumbuhi oleh satu jenis mikroba. Setiap media dapat ditumbuhi oleh beberapa jenis mikroba. Makin spesifik suatu media, maka semakin sedikit jenis mikroba yang dapat tumbuh pada media tersebut, dengan demikian makin baik media tersebut untuk menetapkan jenis mikroba kontaminan. Namun karena tidak ada satu jenis media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu jenis mikroba, maka perlu menggunakan kombinasi beberapa media. Bila menggunakan media seperti dianjurkan oleh Farmakope, pada umumnya sudah cukup untuk menetapkan jenis mikroba kontaminan patogen yang dipersyaratkan. Bila menggunakan beberapa media secara bersama dapat menimbulkan permasalahan, karena jika kontaminan lebih dari satu jenis maka koloni pada media yang berbeda mungkin dari jenis berbeda. Dengan demikian media satu tidak memperkuat kesimpulan dari media yang lain. Disamping itu, penggunaan beberapa media secara bersama dapat menjadi pemborosan.

Untuk mengantisipasi hal ini dapat dilakukan satu media pada tahap pertama dan dilanjutkan dengan media lain jika hasilnya meragukan. Namun yang menjadi pertanyaan media mana yang didahulukan. Untuk menentukan media yang dipergunakan maka diperlukan analisa mengenai sifat mikroba yang diuji dan media yang digunakan. Komponen yang terkandung pada media dan reaksi/respon yang terjadi bila

suatu jenis mikroba tumbuh merupakan pengetahuan yang sangat diperlukan. Dari pengetahuan tersebut maka urutan media yang digunakan akan lebih mudah ditentukan dan hasilnya akan saling memperkuat untuk menetapkan jenis kontaminan tersebut. Namun dengan cara demikian walaupun dapat menghemat penggunaan media dan jenis kontaminan dapat ditetapkan dengan yang lebih baik tetapi memerlukan waktu pengujian lebih lama.

KEPUSTAKAAN

1. Difco Manual. 1984.
2. European Pharmacopeia. 1997 ; 83-8.
3. Farmakope Indonesia-IV. 1995; 847-55.
4. Merck Manual. 1988.
5. United States Pharmacopieae-23. 1985 ; 1681-86.

English Summary

(Sambungan halaman 4)

BACTERIA SENSITIVITY AGAINST QUINOLONES AND CEPHALOSPORINES

Agus Sjahrurachman, Widyasari Kumala, Tassimin Nurjadi

Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

161 bacterial isolates from respiratory tract, pus, blood and faeces consisted of 32 strains of *K. pneumoniae*, 32 strains of *S. aureus*, 27 strains of *Str. beta haemolyticus*, 9 strains of *Str. pneumoniae*, 30 strains of *B. catarrhalis* and 31 strains of *E. coli* are subjected to test for Minimal Inhibitory of Antibiotic Concentration determination. Result indicate that none of bacteria tested is resistant to sparfloxacin. Some bacteria, however, have been resistant to ciprofloxacin, cefotaxime or cefaclor *Str. pneumoniae* and *Str. beta haemolyticus* strains to ciprofloxacin, *K. pneumoniae*

and *S. aureus* strains to cefotaxime, *K. pneumoniae* and *E. coli* to cefaclor. In addition, one strain of Methicillin resistant *S. aureus* resistant to all antibiotic tested is also isolated.

Comparative analyses with data from abroad indicate that antibacterial activity of antibiotics depend upon species and geo-graphic origin of the bacteria.

Cermin Dunia Kedokt, 1999; 124: 17-20

As, Wk, Tn

HEPATITIS VIRUS-G: ITS ORIGIN, MOLECULARBIOLOGY AND CLINICAL APPLICATIONS

Suwarso

Virology-Immunology Dept., Clinical Pathology Lab., Faculty of Medicine, Gadjah Mada University/Dr. Sardjito General Hospital, Yogyakarta, Indonesia

Since 1975, the name PTH Non-A, Non-B have been pro-

posed as posttransfusion hepatitis (PTH) that both seronegative for markers of HBV and HAV. At least there exist 2 undefined PTH-NANB viruses by conventional methods. One of these viruses in 1989 was discovered by the relatively new molecularbiology technology and named Hepatitis-C virus (HCV), a major agent PTH-NANB distributed in different clinical specimens world-wide by different sub types. In the middle of 1995 the implementation of this same technology have also discovered 5 new hepatitis viruses named GBV-A, -B, -C, HGV, and HTTV that Would be responsible in 10% of acute-PTH non-A-C, 18% of community acquired hepatitis, 12% of PTH non-A-E, and in 8,1% of chronic hepatitis non A-E.

Cermin Dunia Kedokt, 1999; 924: 39-6

So