

Kajian Pustaka : Uji Kepekaan Antibiotik pada *Corynebacterium diphtheriae*

Kambang Sariadji¹, Masri Sembiring¹

¹Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI

*E-mail: kambang_sar@yahoo.com

Abstract

One treatment strategy for bacterial infection cases of the genus *Corynebacterium* either potentially pathogenic or not pathogenic for humans is by giving antibiotics. The antibiotics susceptibility test to determine whether antibiotics that have been used for the treatment is still effective or already decreased activity should be conducted before treatment. The susceptibility test for *Corynebacterium* spp and *C.diphtheriae* in laboratory have some obstacles. The aims of this is to review the selection of method susceptibility test for *Corynebacterium* and *C.diphtheria* based on and produce a recommendation of test that can be implemented in laboratory. The MIC (minimum inhibitory concentration) dilution broth method is the gold standard for susceptibility test. However this technique is laborious. The automatically technique is simpler, but for some limited setting laboratory the automatic machine is costly. The comparison of liquid dilution method, agar diffusion strips E-test method and disk diffusion method showed that the agreement those method above 94%. Then the diffusion strips E-test method and disk diffusion method have 95.1% agreement. Furthermore, the liquid dilution method has 95.2% agreement. Because those methods have good level agreement, the diffusion agar method either the disk or strip (E-Test) could be used as an alternative method in the laboratory.

Key Words : *Corynebacterium diphtheriae*, Antimicrobial, Susceptibility

Abstrak

Salah satu strategi pengobatan pada kasus infeksi bakteri dari genus *Corynebacterium* baik yang berpotensi patogen atau tidak patogen pada manusia adalah dengan cara pemberian antibiotik. Pemantauan antibiotik harus terus dilakukan dengan melakukan uji kepekaan antibiotik secara invitro untuk mengetahui apakah antibiotik yang selama ini digunakan untuk pengobatan masih efektif atau sudah mengalami penurunan aktifitasnya. Permasalahan dalam uji kepekaan antibiotik di laboratorium terhadap *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* adalah pada pemilihan metode, jenis antibiotik, dan penentuan *breakpoints*. Kajian ini bertujuan untuk menentukan pemilihan metode uji kepekaan antibiotik terhadap *Corynebacterium* spp dan *C.diphtheriae*, sehingga metode tersebut dapat diterapkan di laboratorium. Penelusuran pustaka menunjukkan Metode MIC (*minimum inhibitory concentration*) dilusi agar cair merupakan baku standar dalam uji kepekaan antibiotik. Metode ini jika dilakukan secara konvensional memerlukan waktu dan tenaga yang tidak sedikit serta tingkat kesalahannya yang tinggi. Jika dilakukan secara otomatis, walaupun cukup baik, namun biayanya cukup mahal. Hasil yang didapat dalam membandingkan metode agar dilusi cair, agar difusi strips E-test dan agar difusi disk menunjukkan kesesuaian diatas 94%, sementara metode agar difusi strips E-test dan agar difusi disk mempunyai kesesuaian 95,1%, sedangkan dengan metode agar dilusi cair didapatkan kesesuaian sebesar 95,2%. Dengan tingkat kesesuaian yang cukup baik ini, maka penggunaan metode difusi agar dengan disk dan strip (E-Test) menjadi alternative yang lebih mudah dan murah dilakukan di laboratorium.

Kata Kunci : *Corynebacterium diphtheriae*, Antimikroba, Kepekaan

Pendahuluan

Pada tahun 1896 genus *Corynebacterium* pertama kali disampaikan oleh Lehman and Neumann 1896. Genus *Corynebacterium* terdiri dari berbagai kelompok bakteri yang

merupakan patogen pada manusia dan hewan dan sebagian yang lain merupakan flora normal di berbagai organ terutama kulit dan saluran napas. *Corynebacterium* meliputi minimal 46 spesies dan 31 di antaranya berhubungan dengan kesehatan.¹ Umumnya mereka ditemukan di tanah dan

air serta tinggal di kulit dan membran mukosa manusia dan hewan. *Corynebacterium diphtheriae* merupakan spesies utama yang menyebabkan penyakit pada manusia. Selain *Corynebacterium diphtheriae* ada spesies lain yang mampu memproduksi toksin difteri, yaitu *Corynebacterium ulcerans* dan *Corynebacterium pseudotuberculosis*.¹ *Corynebacterium* lainnya yang tidak patogen manusia dan hewan dan sebagian yang lain merupakan flora normal di berbagai organ terutama kulit dan saluran napas. Walaupun demikian jenis bakteri yang tidak patogen tersebut dapat menjadi patogen oportunistik pada predisposisi pasien dengan kondisi yang imunokompromise. Bakteri ini juga dilaporkan sebagai bakteri yang bertanggung jawab terhadap infeksi saluran napas seperti pneumoniae dan bronchitis pada pasien yang imunokompromise, sehingga penanganan pengobatan perlu dijadikan perhatian.^{1,2,3}

Strategi pengobatan pada kasus infeksi bakteri dari genus *Corynebacterium* baik yang berpotensi patogen atau tidak patogen pada manusia dan hewan adalah dengan cara pemberian antibiotik. Pemberian antibiotik pada umumnya adalah mengeliminasi bakteri, sementara pada *C.diphtheriae* pemberian antibiotik tidak hanya untuk mengeliminasi bakteri tapi juga untuk menetralisasi toksin yang beredar dalam darah atau yang belum berikatan dengan sel/jaringan serta mencegah penularan di masyarakat sekitarnya. Beberapa antibiotik pilihan yang digunakan untuk kasus infeksi *Corynebacterium* adalah Penicillin dan Eritromicin, antibiotik lainnya adalah Trimethoprim sulfamethoxazole, tetracyclin, clindamycin dan vancomycin.^{4,5}

Kasus resistensi antibiotik pada genus *Corynebacterium* sering dilaporkan diantaranya pada kasus difteri yang disebabkan oleh *C.diphtheriae*. Pengujian resistensi antibiotik terhadap *C.diphtheriae* pada tahun 1982 menunjukkan jenis

penicillin dan makrolide di Indonesia masih dianggap sensitif, namun resistensi terhadap tetracyclin sangat tinggi.⁶ Penelitian lainnya melaporkan bahwa adanya resisten terhadap penicillin G, oxacillin, erythromycin, dan antibiotik lainnya yang digunakan sebagai pengobatan infeksi *C.diphtheriae* seperti rifampicin, tetracycline, dan clindamycin.^{5,6} Pada kasus endokarditis dan kasus infeksi sistemik yang disebabkan oleh *C.diphtheriae*. pemberian antibiotik penisilin menjadi pertimbangan bila diketahui terdapat resistensi dari penisilin, karena berdampak pada kegagalan pengobatan.⁵ Pada penelitian lainnya menyebutkan bahwa jenis spesies *Corynebacterium* yang berhubungan dengan penyakit oportunistik menunjukkan resistensi antibiotik lebih tinggi dibandingkan dengan *Corynebacterium* yang berpotensi patogen seperti *C.diphtheriae* toksigenik dan non toksigenik.^{7,8} Timbulnya kasus *Multidrug resistance* (MDR) pada genus *Corynebacterium* akan menambah permasalahan dalam pengobatan yang disebabkan oleh infeksi *corynebacterium* termasuk *C.diphtheriae*.

Pemantauan antibiotik secara berkala harus dilakukan dengan melakukan uji kepekaan antibiotik secara invitro. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah antibiotik yang selama ini digunakan untuk pengobatan masih efektif atau sudah mengalami penurunan aktifitasnya terhadap *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae*. Permasalahan dalam uji kepekaan antibiotik di laboratorium terhadap *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* adalah pada pemilihan metode, pemilihan jenis antibiotik, penggunaan pedoman uji antibiotik dan penentuan *breakpoints*. Kajian ini bertujuan untuk menentukan hal-hal yang menjadi perhatian dalam uji antibiotik *Corynebacterium* termasuk *C.diphtheriae* secara invitro, sehingga dalam pelaksanaan uji antibiotik dapat disesuaikan dengan kondisi dan metode yang ada.

Metode

Penelusuran literatur dilakukan melalui pencarian informasi ilmiah terkait metode uji kepekaan antibiotik terhadap *Corynebacterium diphtheriae* yang diterapkan di laboratorium dalam periode 1982-2018. Hasil penelusuran literatur dilakukan analisa secara deskriptif

Hasil

Dari pencarian literatur berupa buku, jurnal dan *packed insert* (petunjuk pabrikan) melalui kepustakaan didapatkan terbitan antara tahun 1982–2018 yang terdiri dari 8 buku yang membahas secara mendalam tentang karakteristik *Corynebacterium diphtheriae* dan pedoman pengujian kepekaan antibiotik, kemudian ada 14 jurnal internasional dan 3 *packed insert* yang membahas penggunaan dan perbandingan metode pengujian kepekaan antibiotik.

Pembahasan

Kriteria sampel yang digunakan dalam setiap metode pengujian kepekaan *Corynebacterium* menggunakan biakan bakteri murni dari *Corynebacterium diphtheriae* atau jenis *Corynebacterium* lainnya. Biakan bakteri murni yang diperkenankan harus berumur 18-24 jam. Setelah bakteri murni disiapkan kemudian dilanjutkan dengan pengujian sesuai dengan metode yang ditentukan .

Nilai *breakpoints* adalah nilai *range* yang digunakan dalam penentuan konsentrasi antibiotik pada uji kepekaan apakah bakteri yang diuji masuk dalam kategori resisten, intermediate atau sensitif. Nilai *breakpoints* ini untuk metode difusi agar dan dilusi agar berbeda. Tiap-tiap spesies bakteri juga mempunyai atau bahkan juga sama nilai *breakpoints*-nya. Nilai *breakpoints* dapat dilihat pada *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* dulunya bernama *National Commite For clinical Laboratory Standard (NCLSI)* atau dapat juga mengacu pada referensi *European*

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Corynebacterium diphtheriae* mempunyai *breakpoints* tergantung metode yang digunakan. Berikut beberapa metode pengujian kepekaan dan nilai *breakpoints* berdasarkan beberapa rujukan khusus untuk *Corynebacterium diphtheriae*.

Beberapa metode uji kepekaan yang dilakukan berdasarkan rujukan adalah sebagai berikut:

1. Metode Dilusi Agar Cair

Metode dilusi agar cair/*broth dilution test* (serial dilution): metode ini mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration*) KHM (kadar hambat minimum) dan MBC (*minimum bactericidal concentration*). Prosedur uji ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri murni pada medium cair yang mengandung pengenceran bertingkat suatu agen antibiotika. Nilai KHM ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan media nampak jernih. Penentuan nilai KHM dilakukan dengan menumbuhkan ulang bakteri yang ada di dalam tabung KHM dalam media cair yang tidak ditambahkan antibiotika dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam. Pada media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM. Metode ini merupakan standar baku emas dalam pengujian kepekaan antibiotik.^{9,10}

Metode dilusi agar cair dapat dilakukan secara manual atau menggunakan alat otomatis seperti Vitex, Phoenix, Sensititre.¹¹ Metode dilusi agar cair secara manual dianggap kurang efektif dan efisien karena dalam persiapannya di laboratorium memerlukan banyak waktu dan tenaga serta kemungkinan tingkat kesalahannya lebih tinggi.^{11,12} Pada metode dilusi cair dengan alat otomatis mempunyai tingkat kepercayaan yang cukup baik, namun perlu dipertimbangkan dari sisi biaya, efisiensi dan efektifitas aplikasinya dilapangan, mengingat

mahalnya alat otomatis, ketersediaan bahan dan masih jarang nya uji resistensi antibiotik untuk *Corynebacterium*. Metode uji antibiotik *Corynebacterium* yang direkomendasikan berdasarkan CLSI terkini adalah CLSI M45. Kriteria yang digunakan untuk uji antibiotik sesuai CLSI M45 adalah: menggunakan menggunakan Medium *Cation-Adjusted Mueller Hinton*

Broth-Lysed Horse Blood 2,5% - 5 % V/V (CAMHB-LHB), konsentrasi inokulum 0,5 McFarland, suhu inkubasi 35°C, 24-48 jam serta menggunakan Quality Control : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 dan *E.coli* ATCC 25922 (untuk gentamicin).¹³ Sementara nilai *cut off* nilai *breakpoints* dapat dilihat pada table 1.

Tabel 1. Nilai breakpoints *Corynebacterium* spp (termasuk *C.diphtheriae*) metode dilusi agar cair mengacu pada CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015¹⁴

No	Nama Antibiotik	Nilai (<i>Breakpoints</i>) MIC dalam ug/mL		
		S	I	R
1	Penisilin	≤ 0,12	0,25-2	≥ 4
2	Ciprofloksasin	≤ 1	2	≥ 4
3	Gentamisin	≤ 4	8	≥ 16
4	Vancomisin	≤ 2	-	-
5	Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16
6	Klindamisin	≤ 0,5	1-2	≥ 4
7	Linezolid	≤ 2	-	-
8	Rifampin	≤ 1	2	≥ 4
9	Trimethropin sulfamethoxazole	≤ 2/38	-	≥ 4/76
10	Eritromisin	≤ 0,5	1	≥ 4

Keterangan : S: sensitif, I: Intermediate, R: Resisten

2. Metode Difusi Agar Strip/psilometer (E-test)

Metode difusi agar strip/epsilometer (E-test) merupakan pengujian kuantitatif yang digunakan untuk mengestimasi MIC atau KHM. Konsentrasi minimal (MIC/KHM) suatu agen antibiotik untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antibiotik dengan kadar konsentrasi terendah sampai tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasikan bakteri yang dimaksud.¹¹ Pengamatan dan pengukuran dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang menunjukkan kadar agen antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri. Metode agar strip ini lebih praktis, mudah digunakan dan hasilnya lebih akurat dibandingkan dengan

metode MIC dilusi agar. Keterbatasan dari metode difusi agar strip ini adalah harganya mahal. Produk E-test yang dapat dijumpai adalah produk E-test (Biomereux) dan Ezy MIC (Himedia). Beberapa bahan dan tahap penting dalam panduan dalam pengujian kepekaan antibiotik *Corynebacterium diphtheriae* yang mengacu pada CLSI 45A tahun 2006, diantaranya; menggunakan medium: Muhler Hinton Agar darah dengan 5 % darah domba atau kuda, konsentrasi Inokulum : 0,5 McFarland, suhu Inkubasi 37°C, 18-20 jam serta menggunakan Quality Control : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 dan penggunaan *E.coli* ATCC 25922 (untuk gentamicin).¹³

Metode difusi agar strip/epsilometer (E-test) digunakan sebagai alternatif dari metode baku dilusi agar cair dan

mempunyai kesesuaian yang baik. Kedua metode (E-test dan difusi agar cakram) dapat digunakan untuk uji kepekaan *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtherae* dengan pertimbangan efisien dan efektifitas di lapangan, karena kedua metode tersebut mempunyai kesesuaian

94,9%.⁴ Metode difusi agar cakram dapat juga digunakan untuk penentuan profile multiresistensi. Kedua metode tersebut sama-sama menggunakan media Mueller Hinton Agar dengan penambahan darah domba 3-5%.⁴

Tabel 2. Quality Control untuk MIC agar dilusi cair dan MIC E-Test : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 dan *E.coli* ATCC 25922 (untuk gentamicin) mengacu pada CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015¹²

Nama Antibiotik	MIC QC Range (ug/mL)	
	ATCC 49619 <i>S.pneumoniae</i>	ATCC 25923 <i>E.coli</i>
Amoxicillin	0,03 - 0,12	-
Amoxicillin-clavulanate	0,03/0,015 - 0,12/0,06	-
Ampicillin	0,06 - 0,25	-
Ampicillin-sulbactam	-	-
Azthromycin	0,06 - 0,25	-
Cefipime	0,03 - 0,25	-
Cefotaxime	0,03 - 0,12	-
Ceftriaxone	0,03 - 0,12	-
Chloramphenicol	2 - 8	-
Ciprofloxacin	0,25 - 1	-
Clarithromycin	0,03 - 0,12	-
Clindamycin	0,03 - 0,12	-
Daptomycin	0,06 - 0,5	-
Doxycycline	0,15 - 0,12	-
Erythromycin	0,03 - 0,12	-
Gatifloxacin	0,12 - 0,5	-
Gentamicin	-	0,25 - 1
Imipenem	0,03 - 0,12	-
Levofloxacin	0,5 - 2	-
Linezolid	0,25 - 2	-
Meropenem	0,06 - 0,25	-
Minocycline	-	0,25 - 1
Moxifloxacin	0,06 - 0,25	-
Penicillin	0,25 - 1	-
Quinupristin-dalfopristin	0,25 - 1	-
Rifampin	0,015 - 0,06	-
Tetracycline	0,06 - 0,5	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	0,12/2,4 - 1/19
Vancomycin	0,12 - 0,5	-

Tabel 2 ini merupakan tabel *Quality control* pengujian kepekaan antibiotik terhadap *C.diphtheriae*, menggunakan bakteri kontrol *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 dan *E.coli*

ATCC 25922. Jika nilai kontrol bakteri tersebut diantara nilai range table tersebut, maka pemeriksaan pengujian kepekaan bakteri *C.diphtheriae* dianggap valid.

Tabel 3. Nilai breakpoints *Corynebacterium* spp (termasuk *C.diphtheriae*) metode difusi agar Strip E-Test mengacu pada CLSI M45-A , 2006 dan CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015¹²

No	Nama Antibiotik	Nilai (<i>Breakpoints</i>)MIC dalam ug/mL		
		S	I	R
1	Penisilin	≤ 1	2	≥ 4
2	Ciprofloksasin*	≤ 1	2	≥ 4
3	Gentamisin *	≤ 4	8	≥ 16
4	Vancomisin	≤ 4	-	-
5	Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16
6	Klindamisin	≤ 0,5	1 – 2	≥ 4
7	Linezolid	≤ 2	-	-
8	Rifampin	≤ 1	2	≥ 4
9	Trimethropin sulfamethoxazole	≤ 2	-	≥ 4
10	Eritromisin	≤ 0,5	1	≥ 2

Keterangan : * : nilai antibiotik yang mengacu pada CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015 : S: sensitif, I: Intermediate, R: Resisten

3. Metode Difusi Cakram (Uji Kirby Bauer)

Metode ini merupakan penentuan aktivitas agen antibiotik terhadap bakteri. Cakram yang berisi agen antibiotik diletakkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri tertentu yang akan berdifusi pada agar media tersebut. Adanya area jernih menunjukkan adanya daya hambat pertumbuhan bakteri oleh agen antibiotik pada permukaan agar darah. Metode ini dalam penerapannya di laboratorium sangat mudah dan murah. Kriteria dalam interpretasi lebih direkomendasikan untuk gram positif seperti dari *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Karena tidak adanya panduan uji kepekaan antibiotik untuk *Corynebacterium diphtheriae* metode difusi disk dalam CLSI, namun beberapa jurnal menyebutkan bahan dan metode pengujian kepekaan antibiotik *Corynebacterium* diantaranya adalah menggunakan medium : Muhler Hinton Agar darah dengan 5 % darah domba atau

kuda, konsentrasi inokulum 0,5 McFarland, suhu inkubasi 37°C, 18-20 jam dan menggunakan Quality Control : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 atau *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.^{4,15-17}

Penelitian uji kepekaan antibiotik menggunakan ketiga metode diatas pernah dilakukan oleh Carolyn N Baker menggunakan 195 bakteri gram negatif dan gram positif dengan 14 jenis antibiotik. Hasil yang didapat dalam membandingkan metode agar dilusi cair, agar difusi strips E-test dan agar difusi disk menunjukkan kesesuaian diatas 94%. sementara metode agar difusi strips E-test dan agar difusi disk mempunyai kesesuaian 95,1%, sedangkan dengan metode agar dilusi cair didapatkan kesesuaian sebesar 95,2%. Penelitian yang sama menggunakan bakteri *Corynebacteria* dalam membandingkan antara agar difusi strip E-test dan agar difusi disk didapatkan perbedaan 5,1%.

Tabel 4. Quality Control untuk difusi cakram *Staphylococcus aureus* 25923 mengacu pada CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015¹²

Nama Antibiotik	Nilai QC Range difusi cakram	
	Konsentrasi Disk (ug/mL)	ATCC 25923 <i>S.aureus</i> (diameter dalam mm)
Amikacin	30	20 - 26
Amoxicillin-clavulanate	20 / 10	28 - 36
Ampicillin	10	27 - 35
Ampicillin-sulbactam	10 / 10	29 - 37
Azthromycin	15	21 - 26
Aztreonam	30	-
Cefazolin	30	29 - 35
Cefepine	30	23 - 29
Cefotaxime	30	25 - 31
Cefoxitin	30	23 - 29
Ceftazidime	30	16 - 20
Ceftriaxone	30	22 - 28
Cefuroxime	30	27 - 35
Cephalothin	30	29 - 37
Chloramphenicol	30	19 - 26
Ciprofloxacin	5	22 - 30
Clarithromycin	15	26 - 32
Doxycycline	30	23 - 29
Ertapenem	10	24 - 31
Erythromycin	15	22 - 30
Gentamicin	10	19 - 27
Imipenem	10	-
Levofloxacin	5	25 - 30
Meropenem	10	29 - 37
Ofloxacin	5	24 - 28
Piperacillin	100	-
Piperacillin-tazobactam	100/10	27 - 36
Tetracycline	30	24 - 30
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1,25/23,75	24 - 32

Tabel 5. Nilai breakpoints *Corynebacterium* spp (termasuk *C.diphtheriae*) metode difusi agar cakram mengacu pada CLSI M100-S25 tahun 2015 untuk bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus*.¹⁵

No	Nama Antibiotik	Nilai (Breakpoints) dalam mm		
		S	I	R
1	Penisilin 10 ug	≥ 20	-	≤ 25
2	Ciproflokasin 5 ug *	≥ 21	16 - 20	≤ 15
3	Moksifloksasin 5 ug	≥ 18	15 - 17	≤ 14
4	Gentamisin 10 ug *	≥ 15	13 - 14	≤ 12
5	Vancomisin 30 ug	≥ 17	-	≤ 17
6	Tetrasiklin 30 ug	≥ 28	25 - 27	≤ 24
7	Klindamisin 2 ug	≥ 19	16 - 18	≤ 15
8	Linezolid 30 ug	≥ 21	-	≤ 22
9	Rifampin 5 ug	≥ 19	17 - 18	≤ 16
10	Trimethropropin sulfamethoxazole	≥ 19	16 - 18	≤ 15
11	Eritromisin 15 ug	≥ 15	16 - 20	≤ 15

Keterangan : * nilai antibiotik yang mengacu pada nilai range *Staphylococcus aureus*, S: sensitif, I: Intermediate, R: Resisten

Tabel 6. Perbandingan metode pemeriksaan pengujian kepekaan antibiotik terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium* lainnya

Dilusi agar cair	Difusi agar strip	Difusi cakram
MIC yang merupakan Standar baku emas	MIC setara dengan baku emas	Tidak rekomendasi
tingkat kontaminasinya tinggi memerlukan persiapan waktu yang banyak	kontaminasi dapat dikendalikan	Kontaminasi dapat dikendalikan
Sukar dilakukan	Waktu persiapan singkat	Waktu persiapan singkat
Murah	Mudah dilakukan	Mudah dilakukan
	Mahal	Murah
Ketiga metode mempunyai Kesesuaiannya mencapai 94%		
Metode difusi agar strip dan difusi cakram mempunyai kesesuai mencapai 95,1%		
Metode dilusi agar cair dan difusi agar strip mempunyai kesesuai mencapai 95,2%		

Pemilihan Antibiotik Untuk Uji Kepekaan

Beberapa pertimbangan pemilihan agen antibiotik untuk uji kepekaan *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* berdasarkan pertimbangan spektrum antibakteri obat tersebut, sifat farmakokinetik, toksisitas, efektivitas, dan ketersediaannya, serta biayanya bagi pasien dan komunitas. Namun saat ini beberapa panduan dalam pemeriksaan uji kepekaan antibiotik terhadap *Corynebacterium* spp dan *C.diphtheriae* dari CLSI dan EUCAST telah tersedia. Prioritas pemilihan antibiotik terutama pada jenis penisilin, eritromisin, gentamisin dan vankomisin. Beberapa antibiotik lainnya dapat berupa rifampisin, linezolid, klindamisin, ciprofloksasin, moksifloksasin dan tetrasiklin. Pada kasus infeksi *C.diphtheriae* antibiotik yang digunakan sesuai program yang direkomendasikan adalah penisilin dan eritromisin. Pertimbangan lainnya untuk uji kepekaan adalah didasarkan pada pemilihan antibiotik secara empirik pada kasus infeksi saluran pernafasan akut diantaranya septriakson dan penisilin.^{14,15,17-18}

Pertimbangan Pemilihan Alat Otomatis

Perkembangan teknologi identifikasi bakteri termasuk uji kepekaan antibiotik secara fenotik telah berkembang dengan

pesat. Perkembangan ini didasari banyaknya jenis bakteri patogen yang secara konvensional sukar dideteksi. Metode konvensional juga terkesan kurang efektif dan efisien serta memerlukan waktu dan jumlah personil yang tidak sedikit. Penggunaan alat otomatis identifikasi dan uji kepekaan bakteri dapat meningkatkan kemampuan temuan bakteri patogen yang dimaksud. Beberapa alat otomatis saat ini telah tersedia sebagai pengganti identifikasi dan uji kepekaan antibiotik secara konvensional. Penggunaan metode konvensional juga tidak serta merta ditinggalkan, dalam pelaksanaannya dalam identifikasi dan uji kepekaan antibiotik bakteri juga diperlukan, karena penggunaan alat otomatis tidak 100% persen otomatis diantaranya pemilihan medium selektif, pemilihan koloni spesifik dan pertumbuhan koloni murni.^{20,21}

Beberapa pertimbangan dalam pemilihan alat identifikasi dan uji kepekaan antibiotik bakteri berdasarkan tujuan dari penggunaan alat tersebut, apakah memang sesuai dengan kebutuhan rutinitas pekerjaan atau tidak, selanjutnya ketersediaan ruangan yang memadai dan teknisi yang mengoperasikan alat, serta populasi distribusi alat. Hal ini sangat penting berkenaan dengan ketersediaan bahan pendukung dan perhatian pengguna. Makin banyak tingkat populasi makin mudah kita mendapatkan ketersediaan

bahan. Makin banyak pengguna alat makin banyak informasi yang kita dapat tentang alat tersebut. Seberapa banyak sampel yang dapat dikerjakan dan seberapa cepat alat tersebut dapat menyelesaikan pemeriksaan. Data base jenis spesies bakteri yang diidentifikasi dan beberapa alat ada yang hanya mampu mengidentifikasi sampai tingkat genus, perhatikan juga kesesuaian cartridge deteksi dengan target bakteri yang dicari, apakah pada cartridge untuk identifikasi gram negatif/positif atau khusus bakteri tertentu (disesuaikan kebutuhan pemeriksaan). Untuk uji kepekaan antibiotik, perhatikan juga ketersediaan jenis antibiotik, kesesuaian nilai range dengan nilai rujukan di CLSI (makin lebar nilai rangenya, makin baik). Perhatikan juga ketersediaan media pendukung pabrikan seperti Muhler Hinton Agar broth dengan penambahan darah kuda 2,5-5%. Perhatikan juga jenis harga alat dan consumable.²²⁻²⁴

Saat ini ada beberapa alat otomatis yang menawarkan pemeriksaan identifikasi dan uji kepekaan antibiotik diantaranya Vitek, Sensititer, Phoenix, Microscan WalkAway System, TDR-300B

dan masih banyak lagi.²⁰ Alat-alat tersebut mampu dalam identifikasi dan uji kepekaan antibiotik bakteri, namun dalam beberapa hal mungkin mempunyai kemampuan yang berbeda khususnya untuk identifikasi dan uji kepekaan antibiotik bakteri *Corynebacterium* termasuk *Corynebacterium diphtheriae*. Penulis mencoba menyampaikan pengalaman tentang penggunaan alat Sensititre ARIS (*Automated Reading and Incubation System*) khusus untuk identifikasi *Corynebacterium* termasuk *Corynebacterium diphtheriae*.

Alat Sensititre ARIS ini adalah suatu alat yang digunakan untuk pembacaan pertumbuhan bakteri secara *fluorescent*. Kombinasi dan perpaduan alat ini menjadikan pembacaan untuk identifikasi dan uji kepekaan antibiotik menjadi lebih mudah. Untuk identifikasi bakteri, produk ini dilengkapi dengan plate uji biokimia masing-masing untuk identifikasi gram negatif dan gram positif.¹⁹ Uji biokimia ini masing-masing terdiri dari 32 test, untuk identifikasi gram positif uji biokimia yang dilakukan seperti pada table 7.²⁰

Tabel 7. Daftar kemampuan alat sensititre ARIS dengan 32 Uji Biokimia

	1	2	3	4
A	Urea (13g/L)	Esculin (0,02g/L)	Arginine (10g/L)	β -D Galactopyranoside MU (0,1 g/L) FR13
B	β -D-Ribofuranoside MU (0,11 g/L) FR16	Rhamnose (9g/L)	Alanin AMC (0,04 g/L) FR15	Mannitol (9g/L)
C	β -D-Glucopyranoside MU (0,1 g/L) FR14	trehalose (9g/L)	D-Alanin AMC (0,05 g/L) FR17	Maltose (9g/L)
D	β -D-Mannopyranoside MU (0,07 g/L) FR17	Ornithine AMC (0,05 g/L) FR19	Arginine AMC (0,05 g/L) FR20	β -D-Glucuronide MU (0,1 g/L) FR21
E	α -D- Glucopyranoside MU (0,1 g/L) FR22	cystine AMC (0,05 g/L) FR23	Glicerol (10g/L)	Threonine AMC (0,05 g/L) FR24
F	Methionine AMC (0,05 g/L) FR25	Glucose (9g/L)	Sucrose (9g/L)	Proline AMC (0,05 g/L) FR26
G	Serine AMC (0,05 g/L) FR27	β - Methyl Glucoside MU (9 g/L) FR21	Citruline AMC (0,05 g/L) FR28	Pyroglutamate AMC (0,05 g/L) FR29
H	Sorbitol (9g/L)	Tyrosine AMC (0,05 g/L) FR30	Leucine AMC (0,05 g/L) FR31	Valine AMC (0,05 g/L) FR32

Jika identifikasi *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* menggunakan *cartridge plate* tersebut, maka alat tersebut hanya mampu identifikasi sampai tingkat genus dan tidak mampu sampai tingkat spesies. Beberapa test untuk kelengkapan identifikasi *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* seperti uji nitrate, uji Pyrazinamidase, pada *cartridge plate* tersebut tidak tersedia. Uji kepekaan antibiotik menggunakan alat Sensititre ARIS merupakan pengujian dengan

metode dilusi agar cair MIC yang perlu juga dipertimbangkan, mengingat nilai range jenis antibiotik yang tersedia pada kemasan terlalu sempit, sehingga sulit untuk diinterpretasikan. Tidak hanya itu penggunaan kontrol untuk uji kepekaan antibiotik *Corynebacterium* spp termasuk *C.diphtheriae* yakni *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 beberapa nilai kontrol antibiotik tidak tersedia pada database kit Plate cartridge produk alat sensititre.

Tabel 8, Perbandingan nilai ketersediaan jenis antibiotik produk sensititre (GPN3F G+ dan GPALL1F G+) dengan nilai kontrol *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619^{12,24,25}

Kode	Antimikroba	GPN3F G+ (untuk gram negatif)	GPALL1F G+ (untuk gram positif)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 (dalam ug/mL)
AMI	Amikacin			
AMO	Amoxicillin			0,03 - 0,12
AUG	Amoxicillin-clavulanate			0,03/0,015-0,12/0,06
AMP	Ampicillin	0,12-16	0,12-16	0,06 - 0,25
A/S2	Ampicillin-sulbactam			-
AZI	Azthromycin			0,06 - 0,25
AZT	Aztreonam			
CAR	Carbenicillin			
FAC	Cefaclor			
FAZ	Cefazolin			
FEP	Cefipime			0,03 - 0,25
FIX	Cefixime			
FOP	Cefoperazone			
FOT	Cefotaxime			0,03 - 0,12
F/C	Cefotaxime/ clavulanate			
TANS	Cefotetan Na			
FOX	Cefoxitin			
FOXS	Cefoxitin Screen			
POD	Cefpodoxime			
TAZ	Ceftazidime			
T/C	Ceftazidine/ clavulanate Acid			
AXO	Ceptriaxone	8 - 64		0,03 - 0,12
FUR	Cefuroxime			
CEP	Cephalotin			
CHL	Chlorophenicol		2 - 16	2 - 8
CIP	Ciprofloxacin	0,5 - 2	1 - 2	0,25 - 1
CLA	Chlaritomycin			0,03 - 0,12

CLI	Clindamycin	0,12 - 2	0,5 - 2	0,03 - 0,12
COL	Colistin			
DAP	Daptomycin	0,25 - 8	0,5 - 4	0,06 - 0,5
DOR	Doripenem			
DOX	Doxycyline			0,015 - 0,12
DT1,2	D-Test			
ERY	Erytromycin	0,25 - 4	0,25 - 4	0,03 - 0,12
ETP	Ertapenem			
GAT	Gatifloxacin	1 - 8		0,12 - 0,5
GEN	Gentamicin	2 - 16	2 - 16	-
IMI	Imipenem			0,03 - 0,12
LEVO	Levoploxacin	0,25 - 8	0,25 - 4	0,5 - 2
LZD	Linezolid	0,5 - 8	1 - 8	0,5 - 2
LOM	Lomefloxacin			
MERO	Meropenem			0,06 - 0,25
MIN	Minocyclin			-
MXF	Moxifloxacin		0,25 - 4	0,06 - 0,25
NIT	Nitrofurantion		32 - 46	
OXA+	Oxacillin+2%NaCal	0,25 - 8	0,25 - 4	
PEN	Penicillin	0,06 - 8	0,06 - 8	0,25 - 1
PIP	Piperacillin			
P/T4	Piperacillin/Tazobactam			
POL	Polymixin B			
SYN	Quinopristin/dalfopristin	0,12 - 4	0,5 - 4	0,25 - 1
RIF	Rifampin	0,5 - 4	0,5 - 4	0,015 - 0,06
SPA	Sparfloxacin			
STR	Streptomycin			
FIS	Sulfisoxazone			
TET	Tetracycline	2 - 16	2 - 16	0,12 - 0,5
TIC	Ticarcillin			
TIM2	Ticarcillin/ clavulanic Acid			
TGC	Tigecycline		0,03 - 0,5	
TOB	Tobramycin			
SXT	trimetoprim/Sulfamethoxazole	0,5/9,5 - 4/76	0,5/9,5 - 4/76	0,12/2,4 - 1/19
VAN	Vancomycin	1 - 128	0,25 - 32	0,12 - 0,5

Pada table 7 terlihat nilai range konsentrasi *cartridge plate* yang sempit, sehingga tidak bisa digunakan pada pengujian kontrol bakteri seperti kontrol ATCC *Streptococcus pneumoniae* 49619 sesuai petunjuk CLSI M45 edisi ketiga, Oktober 2015. Beberapa additional media seperti *Mueller Hinton Broth* dengan *lysis horse blood 2,5%-5%* yang merupakan syarat mutlak pengujian kepekaan

antibiotik juga tidak tersedia sebagai satu kesatuan pengujian dengan alat Sensititre ARIS. Pembuatan *Mueller Hinton broth* dengan *lysis horse blood 2,5%-5%* pernah juga penulis lakukan dengan melakukan beberapa variasi perlakuan, namun hasilnya tidak memuaskan. Sehingga dapat dikatakan bahwa alat sensititre tidak bisa digunakan untuk kepentingan identifikasi

dan uji kepekaan antibiotik *Corynebacterium* termasuk *C.diphtheriae*.

Beberapa alat otomatis seperti Vitek dan TDR-300B mungkin bisa digunakan untuk kepentingan identifikasi dan uji kepekaan antibiotik *Corynebacterium* termasuk *C.diphtheriae*²⁶, namun sehubungan keterbatasan penulis terhadap alat tersebut, kiranya perlu dipertimbangkan syarat-syarat umum seperti yang telah disampaikan diatas. Perlu dipastikan juga ketersediaan bahan dan alat pendukung dari alat tersebut di Indonesia.

Kesimpulan

Pengujian untuk identifikasi dan uji kepekaan antibiotik bakteri menggunakan berbagai alat otomatis telah tersedia untuk meningkatkan kemampuan deteksi, efisiensi dan efektifitas pemeriksaan. Penggunaan alat-alat otomatis harus diperhatikan spesifikasi plate identifikasi, konsentrasi plate antibiotik sampai dengan ketersediaan bahan pendukung yang satu kesatuan dengan alat tersebut seperti *Mueller Hinton broth* dengan *lysis horse blood* 2,5%-5%. Metode MIC (*minimum inhibitory concentration*) dilusi agar cair merupakan baku standar dalam uji kepekaan antibiotik.

Saran

Perlu pertimbangan secara menyeluruh untuk alternatif penggantinya menggunakan metode difusi agar menggunakan disk dan strip (E-Test).

Daftar Rujukan

1. Acang N. Difteri. Dalam: Noer HMS, editor. Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Ed. ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996.
2. Putranto RH, Sariadji K, Sunarno, Roselinda. *Corynebacterium diphtheriae*: diagnosis laboratorium bakteriologi. 2014. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
3. Sunarno, Pracoyo NE, Sariadji K, Putranto RH. Pengembangan Metode Diagnostik Cepat Laboratorium, Untuk Identifikasi Penyebab Difteri, Aplikasi PCR Multipleks Untuk Identifikasi Cepat Penyebab Difteri. 2015. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
4. Pereira GA, Pimenta FP, dos Santos FRW, Damasco PV, Júnior RH, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2008;103(5): 507-510.
5. Beach MW, Gamble WBJr, Zemp CHJr, and Jenkins MQ. Erythromycin in the treatment of diphtheria and diphtheria carrier state. *Pediatrics*. 1995;16:335-344.
6. Rockhill RC, Sumarmo, Hadiputranto H, Siregar SP, and Muslihun B. Tetracycline resistance of *Corynebacterium diphtheriae* isolated from diphtheria patients in Jakarta, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(5):842-843.
7. Hunolstein CV, Alfarone G, Scopetti F, Pataracchia M, La Valle R, Franchi F, et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *Journal of Medical Microbiology* (2003), 52, 181–188
8. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream Infection Caused by Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an Immunocompromised Host in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* June 2012 Volume 50 Number 6 . p. 2170–2172.
9. Jawetz, Melnick, and Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 2004
10. Pratiwi ST. Mikrobiologi Farmasi. Penerbit Erlangga, Jakarta 2012
11. Packed Insert Produc HiMedia Laboratories. Ezy MIC™ Strips India
12. Stager CE, Davis JE. Automated Systems for Identification of Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, vol 5 no3, July 1992.
13. Sutton S, Qualification of a Microbial Identification System. *Journal of Validation Technology*. 2011.
14. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI document M45 3rd Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; Oktober 2015.
15. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
16. Mina NV, Burdz T, Wiebe D, Rai JS, Rahim T, Shing F, et al. Canada's First Case of a Multidrug-Resistant *Corynebacterium diphtheriae* Strain, Isolated from a Skin

- Abscess. *Journal Of Clinical Microbiology*, Nov. 2011, P. 4003–4005.
17. Efstratiou A, George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Commun Dis Public Health*. 1999; 2: 250-7.
 18. Sharma NC, Banavaliker JN, Ranjan R, and Kumar R. Bacteriological & epidemiological characteristic of diphtheria cases in & around Delhi – A retrospective study. *Indian J Med Res*. 2007;126:545-552.
 19. Kneen R, Giao PN, Solomon T, Van TT, Nguyen T, Long TB, Wain J, Nicholas P. J. et.al. Penisilin vs. Eritromisin in the Treatment of Diphtheria. *Clinical Infectious Diseases* 1998;27:845–50
 20. Olinder A, Antibiotic Resistance and Detection of the Most Common Mechanism of Resistance (MLSB) of Opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy* 2013;59:294–306.
 21. CLSI. *Performance Standars for Susceptibility Testing, Twenty Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 22. Dunne M, Greub G, Novak SM, Patel R. Automation in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Chemistry* 59:12. 2013.
 23. Trek Diagnostic System. GPID Identification Plate For Gram Positive Organisms Sensititre.
 24. Packed Insert More Antimicrobials, More Testing Options. Thermo Scientific Sensititre Standard Formularies.
 25. Biomerieux. The VITEK® 2 Anaerobic and Corynebacteria identification card (ANC) is intended for use with VITEK. 2018
 26. Aryati. Identification and Antimicrobial Susceptibility in Microbiology Automation in The Role of Clinical Pathologist In Disease Control. *Simposium Suramade7*. Juli 2017.