

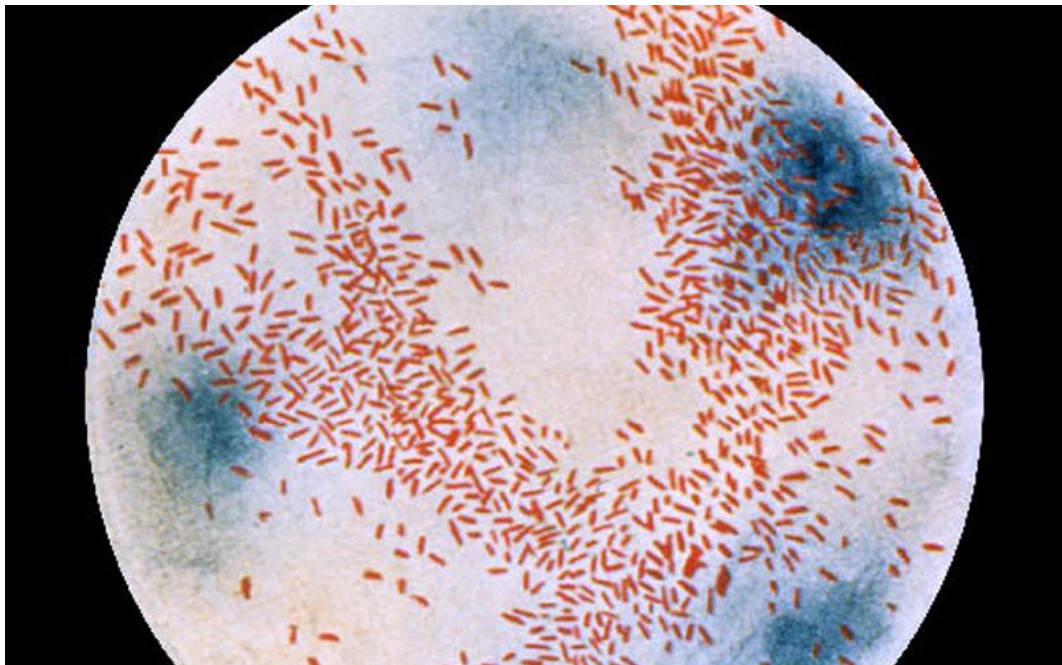
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Haemophilus influenzae*

2.1.1 Karakteristik dan Taksonomi

H. influenzae adalah bakteri berbentuk kokobasil bersifat gram negatif, berukuran kecil (1–2 mm) dan bersifat pleiomorfik.⁸ *H. influenzae* merupakan bakteri non-motil yang terdapat dalam famili *Pasteurellaceae* yang umumnya hidup secara aerob atau dibawah tekanan CO₂ 5%.^{4,17}



Gambar 1. *H. influenzae* dengan pewarnaan gram¹⁸

Klasifikasi bakteri *H. influenzae* :¹⁹

Kingdom :Bacteria

Phylum :Proteobacteria

<i>Class</i>	:Gammaproteobacteria
<i>Ordo</i>	:Pasteurellales
<i>Family</i>	:Pasteurellaceae
<i>Genus</i>	: <i>Haemophilus</i>
<i>Species</i>	: <i>Haemophilus influenzae</i>

2.1.2 Patogenisitas

H. influenzae memiliki tingkat adaptasi yang tinggi terhadap *host* nya, yaitu manusia. Bakteri ini terdapat dalam tenggorokan dari sekitar 75 % anak-anak dan orang dewasa yang sehat. Bakteri ini jarang ditemui di rongga mulut dan belum dapat ditemukan pada selain manusia.¹⁷ Terdapat dua golongan serotipe dari *H. influenzae*, yaitu berkapsul (*encapsulated*) dan tidak berkapsul. Golongan yang berkapsul ini dibagi menjadi 6 serotipe yaitu a, b, c, d, e, f berdasarkan antigen berbeda dari kapsul polisakarida yang dimiliki. Sedangkan bakteri yang tidak berkapsul dikenal dengan *Non-typeable H. influenzae* (NTHi).⁵

H. influenzae tidak memproduksi eksotoksin.²⁰ Kapsul polisakarida tipe B dari bakteri ini mengandung *polyribitol ribose phosphate* (PRP) yang diketahui sebagai faktor virulensi utama. Pili dan adesi pada bakteri akan membantu bakteri melekat pada sel epitel nasofaring, dinding sel bakteri memproduksi endotoksin yang bersifat toksik bagi sel epitel, kemudian bakteri akan masuk menembus barier mukosa.²¹ Kapsul polisakarida ini akan melindungi bakteri dari reaksi imunitas tubuh yaitu fagositosis, sehingga bakteri dapat masuk ke peredaran darah dan menyebar dalam darah.¹⁷ Bakteri *H. influenzae* tipe B merupakan penyebab lebih dari 95 % penyakit invasif pada anak usia kurang dari

5 tahun, seperti meningitis, bakteremia dan sepsis, epiglottitis, pneumonia, artritis septik, osteomielitis, perikarditis, empiema, dan abses.²² Serotipe lain dari *H. influenzae* juga dapat memberikan ancaman timbulnya penyakit di saluran respirasi.²³ NTHi atau *H. influenzae* yang tidak berkapsul membuat koloni di nasofaring dan dapat menginfeksi apabila terjadi kerusakan mukosa akibat infeksi virus atau pada perokok.²⁴

2.1.3 Diagnosis

Diagnosis *H. influenzae* dapat dilakukan dengan pemeriksaan laboratorium yaitu *Latex Agglutination*, PCR dan kultur. *Latex Agglutination (LA)* mendeteksi antigen dan merupakan metode yang sensitif dan cepat untuk mendeteksi kapsul polisakarida²². PCR dapat mendeteksi keenam serotipe kapsul *H. influenzae* dan merupakan *rapid test* yang memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi. Pemeriksaan serotipe juga dapat membedakan bakteri yang berkapsul maupun yang tidak berkapsul.²² Standar baku emas pemeriksaan laboratorium *H. influenzae* adalah kultur. Bakteri ini memiliki kebutuhan yang kompleks dalam media pertumbuhannya (*fastidious*) sehingga seringkali sulit untuk ditumbuhkan.²⁵

2.1.4 Kultur

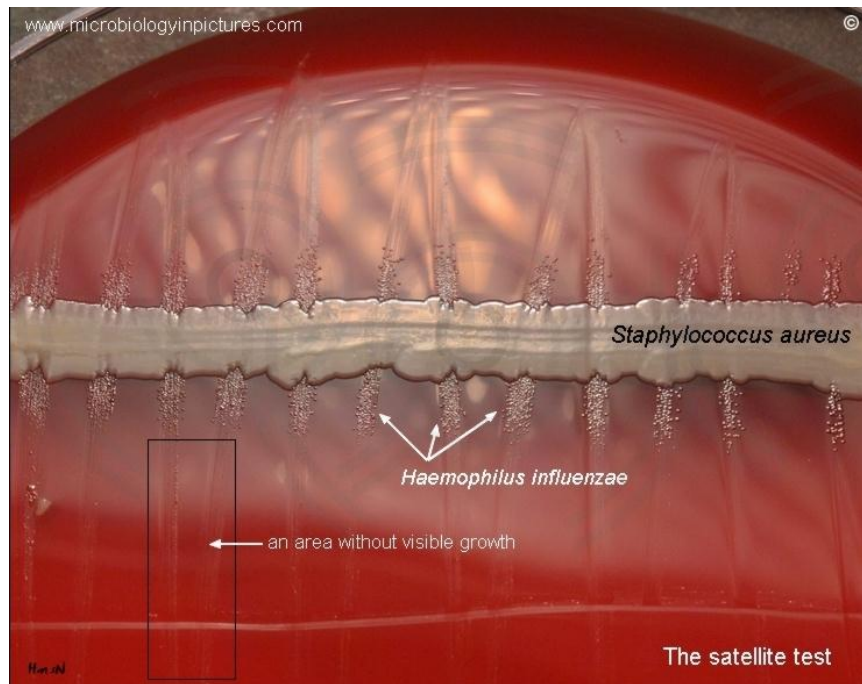
Spesimen yang digunakan untuk kultur adalah cairan tubuh yang normalnya steril seperti CSF (*Cerebro Spinal Fluid*) atau darah.²² *H. influenzae* merupakan organisme *fastidious* yaitu memerlukan nutrisi dan kondisi khusus dalam pertumbuhannya. *H. influenzae* membutuhkan nutrisi dan faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan adalah suatu komponen organik yang

dibutuhkan oleh suatu organisme, yang tidak dapat disintesis oleh dirinya sendiri. Faktor pertumbuhan bakteri *H. influenzae* yaitu faktor X (hemin/hematin) dan faktor V (Nicotinamide Adenine Dinucleotide).⁸ Tidak seperti spesies *Haemophilus* lain yang hanya memerlukan salah satu faktor pertumbuhan, *H. influenzae* membutuhkan keduanya.²⁰

Hemin adalah porfirin yang mengikat besi, yang didapatkan dari sel darah merah, dapat diartikan juga sebagai hematin dan dikenal juga sebagai faktor X.^{26,27} Faktor X telah terdapat dalam eritrosit, namun, akan didapatkan secara optimal apabila eritrosit lisis karena dipanaskan.²¹

Faktor V atau *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD) hanya bisa didapatkan dari eritrosit apabila telah lisis.²¹ NAD terdapat dalam darah, namun tidak tersedia di *blood agar* karena terdapat enzim NADase. Apabila dalam pembuatan media darah dipanaskan pada suhu 80°C, enzim NADase akan rusak dan NAD akan dilepaskan. Sumber NAD selain dari darah adalah derivat ragi.²⁸

H. influenzae dapat tumbuh di media *blood agar* dengan bantuan bakteri *Staphylococcus aureus*. Apabila *S.aureus* dan *H. influenzae* ditanam pada media *blood agar*, koloni *H. influenzae* akan tumbuh di sekeliling koloni *S.aureus* yang dikenal dengan *satellite phenomenon*.²⁸ *S. aureus* β -hemolyticus akan menghemolisis *blood agar* dan mensekresi NAD serta melepaskan hemin ke dalam media, sehingga memungkinkan *H. influenzae* tumbuh di sekitarnya.²⁹



Gambar 2. *Satellite phenomenon*

2.2 Darah yang Digunakan

Darah domba banyak digunakan untuk menumbuhkan bakteri *fastidious*. Darah manusia jarang digunakan karena bakteri menunjukkan perubahan pola pertumbuhan pada *plate* sehingga dapat terjadi kesalahan diagnosis. Darah manusia juga mengandung antibodi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pencucian eritrosit darah manusia dapat mengeliminasi antibodi dalam plasma, platelet serta leukosit,¹⁵ namun, pencucian eritrosit darah manusia tidak memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan darah domba.³⁰

2.3 Agar Coklat dari *Blood Agar Base*

Umumnya bakteri ini ditumbuhkan di agar coklat. Dalam proses pembuatan medianya, terjadi pemanasan, pemanasan ini mengakibatkan faktor X

dan faktor V dilepaskan oleh eritrosit yang mengalami hemolisis ke dalam media dan mengubah warna media menjadi kecoklatan.¹⁷

Agar coklat adalah *blood agar* yang dipanaskan pada suhu 80°C untuk menghasilkan faktor pertumbuhan untuk bakteri–bakteri yang tidak memiliki atau memiliki sedikit hemolisin.³¹

Tabel 2. Formulasi *Blood agar*¹¹

Formula	gram/liter
Proteose peptone	15.0
Liver digest	2.5
Yeast extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

Blood agar (blood agar base) merupakan basis media yang direkomendasikan untuk menumbuhkan bakteri yang membutuhkan darah sebagai sumber faktor pertumbuhannya. *Blood agar* memiliki *proteose peptone* yang diketahui dapat mengasilkan 12,7 % total nitrogen.^{11,12}

Untuk membuat *blood agar* menjadi agar coklat, campurkan 10% darah domba atau kuda pada basis media dengan suhu 80°C, jaga tetap pada suhu tersebut selama 5–10 menit, kocok secara berkala, dinginkan sampai suhunya mencapai 50°C lalu tuang ke *plate*.¹¹

Pada agar coklat, *H.influenzae* tampak sebagai koloni yang berbentuk bulat, besar diameter 1–2 mm, halus, berwarna keabuan dan *opaque* atau berkilau transparan setelah ditumbuhkan selama 24 jam.^{20,32} Koloni juga akan menghasilkan bau yang khas “*mousy odor*” (akibat produksi indol oleh triptofan).³³ Strain berkapsul tampak lebih mukoid dibandingkan dengan strain

tidak berkapsul, yang koloninya tampak lebih kecil, padat keabuan. Tidak terjadi hemolisis maupun perubahan warna pada media agar coklat. Kondisi lingkungan terbaik yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *H. influenzae* adalah pada suhu 35-37° dengan CO₂ 5% dan pH optimal 7,6.⁸



Gambar 3. *H. influenzae* pada agar coklat⁸

2.4 *Tryptic Soy Agar (TSA) base*

TSA sering digunakan sebagai basis media untuk sediaan *blood agar* dengan menambahkan 5% darah domba. TSA mengandung pepton dan kasein sebagai sumber nutrisi dan NaCl untuk mempertahankan osmolaritasnya.³⁴ TSA juga dapat digunakan untuk sediaan agar coklat.³⁵

Tabel 3. Formulasi TSA³⁵

Formula	gram/liter
Pancreatic digest of casein	15.0
Enzymatic* digest of soya bean	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

*mengandung papain

Kasein merupakan substrat utama untuk membentuk pepton, namun substansi lain seperti kedelai (*soybean*) juga dapat membentuk pepton. Pepton

merupakan sumber nitrogen. Pepton yang terdapat pada TSA adalah soypepton (*papaic digest of soyabean*) dan tripton (kasein yang dicerna enzim pankreas). Soypepton mengandung 8,7% nitrogen, sedangkan tripton mengandung total 12,7% nitrogen.¹²

Pepton juga mengandung asam amino triptofan. Pada 1 gram soy pepton terdapat 1,9-3,7 mg asam amino triptofan.³⁶ Pada tripton, setiap gramnya terdapat 6,6 mg asam amino triptofan.³⁷ Asam amino triptofan dapat membentuk niasin yang merupakan unsur pembentuk NAD. Dari 60 mg asam amino triptofan ekuivalen dengan 1 mg niasin.¹⁰

2.5 *Columbia Agar base*

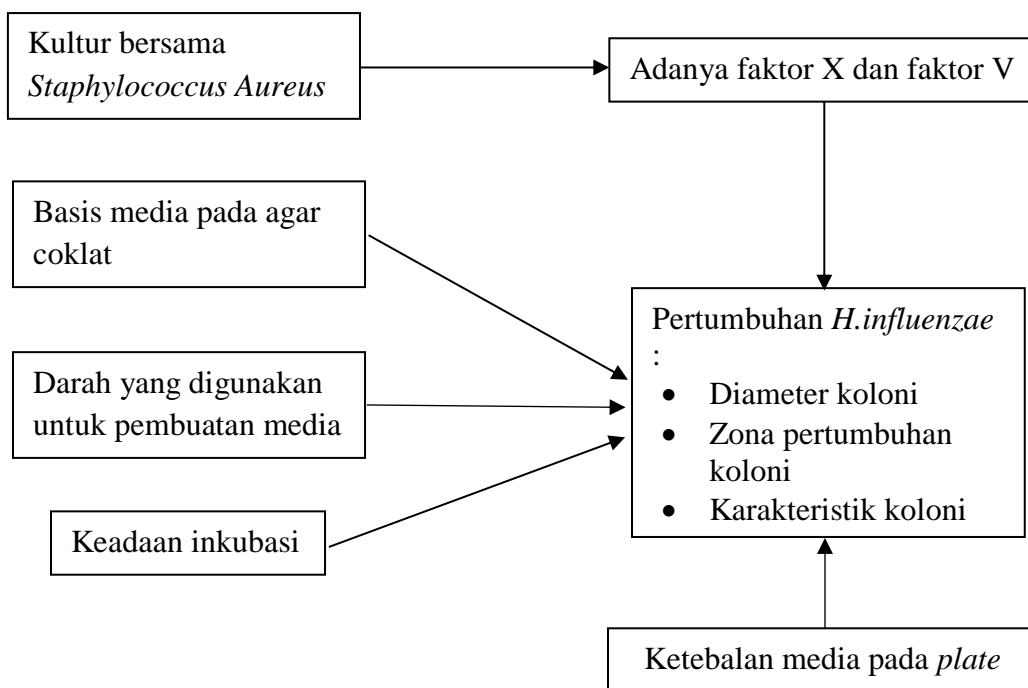
Columbia agar digunakan untuk menanam bakteri yang *fastidious* maupun yang *non-fastidious*. Darah domba maupun darah kuda dapat ditambahkan untuk pembuatan *blood columbia agar*, dapat juga dipanaskan untuk membentuk agar coklat.³⁸ Kasein hidrolisat berfungsi untuk mempercepat dan memperbesar koloni, sedangkan *meat infusion* mempertegas zona hemolisis dan perbedaan karakteristik koloni. *Blood agar* biasa mengandung kasein hidrolisat saja atau hanya media *meat infusion*, namun *columbia agar* mengandung kedua hal tersebut.¹³

Tabel 4. Formulasi *columbia agar*¹³

Typical Formula*	gram/liter
Special peptone	23.0
Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar	10.0
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

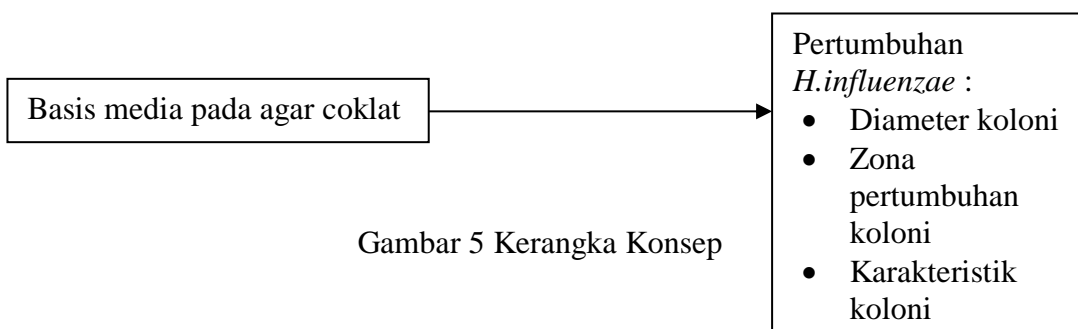
Special peptone adalah campuran pepton yang terdiri atas hasil cerna ragi dan jaringan hewan maupun tumbuhan (*meat, plant and yeast digest*). *Special peptone* mengandung total nitrogen 11,7%.¹²

2.5 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 5 Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

Terdapat perbedaan pertumbuhan *H. influenzae* pada agar coklat dengan basis media *blood agar*, TSA dan *columbia agar* dinilai dari karakteristik, zona pertumbuhan, dan diameter