

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA

No.1852, 2016

KEMENKES. Pemeriksaan Difteri di Labotarium.
Pedoman.

PERATURAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

NOMOR 54 TAHUN 2016

TENTANG

PEDOMAN PEMERIKSAAN DIFTERI DI LABORATORIUM

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA,

- Menimbang** : a. bahwa dalam rangka penanggulangan difteri diperlukan pelayanan laboratorium pemeriksa difteri yang bermutu guna menunjang penegakan diagnosis terhadap penyakit difteri;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a, perlu menetapkan Peraturan Menteri Kesehatan tentang Pedoman Pemeriksaan Difteri di Laboratorium;
- Mengingat** : 1. Undang-Undang Nomor 4 Tahun 1984 tentang Wabah Penyakit Menular (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1984 Nomor 20, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3273);
2. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
3. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2014 tentang Tenaga Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 298, Tambahan Lembaran Negara Republik

- Indonesia Nomor 5607);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 40 Tahun 1991 tentang Penanggulangan Wabah Penyakit Menular (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1991 Nomor 49 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3447);
 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 364/Menkes/SK/III/2003 tentang Laboratorium Kesehatan;
 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 835/Menkes/SK/IX/2009 tentang Pedoman Keselamatan dan Keamanan Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik;
 7. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 411/Menkes/Per/III/2010 tentang Laboratorium Klinik;
 8. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1501/Menkes/Per/X/2010 tentang Jenis Penyakit Tertentu yang Dapat Menimbulkan Wabah dan Upaya Penanggulangan;
 9. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 64 Tahun 2015 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 1508);

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : PERATURAN MENTERI KESEHATAN TENTANG PEDOMAN PEMERIKSAAN DIFTERI DI LABORATORIUM.

Pasal 1

Pedoman pemeriksaan difteri di laboratorium merupakan acuan bagi tenaga kesehatan yang memiliki kompetensi dan kewenangan dalam melakukan pemeriksaan difteri guna menunjang penegakan diagnosis penyakit difteri.

Pasal 2

Lingkup pedoman pemeriksaan difteri di laboratorium meliputi tatacara:

- a. pengambilan, penanganan, dan pengiriman yang dilakukan oleh laboratorium tingkat perifer;
- b. pemeriksaan spesimen oleh laboratorium rujukan provinsi atau laboratorium rujukan regional; dan
- c. uji toksigenitas oleh laboratorium nasional.

Pasal 3

Ketentuan lebih lanjut mengenai pedoman pemeriksaan difteri di laboratorium sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan Menteri ini.

Pasal 4

- (1) Pembinaan dan pengawasan terhadap pelaksanaan Peraturan Menteri ini dilakukan oleh Kementerian Kesehatan, dinas kesehatan provinsi, dan dinas kesehatan kabupaten/kota sesuai dengan tugas, fungsi dan kewenangan masing-masing.**
- (2) Pembinaan dan pengawasan sebagaimana dimaksud pada ayat (1) diarahkan untuk meningkatkan mutu pelayanan laboratorium dalam pemeriksaan difteri.**

Pasal 5

Peraturan Menteri ini mulai berlaku pada tanggal diundangkan.

Agar setiap orang mengetahuinya, memerintahkan pengundangan Peraturan Menteri ini dengan penempatannya dalam Berita Negara Republik Indonesia.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 19 Oktober 2016

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA,

ttd

NILA FARID MOELOEK

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal 6 Desember 2016

DIREKTUR JENDERAL
PERATURAN PERUNDANG-UNDANGAN
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

ttd

WIDODO EKATJAHJANA

LAMPIRAN
PERATURAN MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 54 TAHUN 2016
TENTANG
PEDOMAN PEMERIKSAAN DIFTERI
DI LABORATORIUM

BAB I
PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Distribusi kasus difteri di Indonesia pada tahun 2014 ditemukan hampir di seluruh provinsi di Indonesia. Data Kementerian Kesehatan RI tahun 2014, angka kejadian difteri sebesar 396 kasus pada semua kelompok umur dengan dengan 16 orang meninggal (CFR 2,04%). Kasus paling tinggi ditemukan pada kelompok umur 5-9 tahun yaitu 131 orang (97 anak riwayat imunisasi), diikuti kelompok umur 1-4 tahun (104 orang) dan ≥ 15 tahun (105 orang).

Difteri merupakan penyakit akut dimediasi toksin yang disebabkan oleh bakteri *Corynebacterium diphtheriae*, bakteri basil aerob gram positif. Produksi toksin hanya terjadi saat bakteri tersebut terinfeksi (terlisogenisasi) oleh virus spesifik (bakteriofag) yang membawa informasi genetik toksin tersebut. Hanya strain toksigenik yang dapat menyebabkan penyakit berat. Terdapat empat biotipe bakteri tersebut yaitu gravis, intermedius, mitis, dan belfanti. Semua strain mungkin memproduksi toksin dan menyebabkan penyakit parah. Semua isolat *C. diphtheriae* harus diuji untuk toksigenisitas.

Penularan difteri paling sering dari orang ke orang dari saluran pernapasan, seperti saat pasien batuk atau bersin. Jarang sekali transmisi terjadi melalui lesi kulit atau benda yang tercemar cairan dari pasien.

Organisme memproduksi toksin yang menghambat sintesis protein seluler serta berperan dalam destruksi jaringan lokal dan pembentukan pseudomembran. Pseudomembran tersebut mengandung bakteri, sel inflamasi, dan jaringan nekrotik. Seiring dengan pertumbuhan bakteri, semakin banyak eksotoksin yang diproduksi sehingga inflamasi semakin

berat dan nekrosis. Hal ini kemudian dapat menyebabkan obstruksi jalan napas atau menyebar ke nasofaring, telinga tengah, wajah, mata. Toksin tersebut kemudian diabsorpsi ke dalam pembuluh darah dan didistribusikan ke jaringan tubuh lain. Toksin tersebut berperan dalam komplikasi mayor difteri yaitu miokarditis dan neuritis serta dapat juga menyebabkan trombositopenia dan proteinuria.

Strain yang tidak memproduksi toksin dapat menyebabkan faringitis ringan hingga sedang namun tidak berhubungan dengan pembentukan pseudomembran. Penyakit difteri yang berat jarang terjadi dan kemungkinan disebabkan strain toksigenik yang tidak terdeteksi karena biakan yang inadekuat.

Diagnosis dan tatalaksana difteri berdasarkan tanda dan gejala klinis difteri dengan konfirmasi laboratorium berupa mikroskopis, biakan, dan uji toksigenisitas (uji Elek, PCR). Gejala klinis difteri bergantung pada :

1. lokasi tempat bakteri
2. imunitas penderitanya
3. ada/tidaknya toksin difteri yang beredar dalam sirkulasi darah.

Pencegahan difteri dapat dilakukan dengan vaksinasi dan imunisasi ulangan.

B. TUJUAN

Sebagai acuan pemeriksaan difteri di laboratorium dalam menunjang penegakan diagnosis penyakit difteri meliputi:

1. pengambilan, penanganan, dan pengiriman spesimen.
2. pemeriksaan spesimen mulai dari biakan, isolasi primer, skrining, hingga identifikasi biotipe.
3. uji toksigenisitas.

C. RUANG LINGKUP

Pedoman ini menjelaskan tentang pengambilan, penanganan, dan pengiriman yang dilakukan oleh fasilitas laboratorium tingkat perifer, pemeriksaan spesimen dilakukan oleh laboratorium rujukan provinsi atau regional, dan uji toksigenisitas dilakukan oleh laboratorium rujukan nasional.

BAB II SPESIMEN

A. JENIS SPESIMEN

Keberhasilan dari pemeriksaan difteri sangat bergantung dari proses pengambilan dan penanganan spesimen serta pengirimannya ke laboratorium. Jenis spesimen yang diambil pada pemeriksaan difteri biasanya berasal dari usap tenggorok, usap hidung, usap nasofaring atau dari luka kulit (jika terdapat luka pada pasien tersangka difteri, maka usap luka tersebut harus diambil). Dimungkinkan pula mengambil spesimen dari bagian tubuh lain sesuai dengan lokasi yang terinfeksi misalnya sekret mata pada difteri konjungtiva atau usap vagina pada difteri vagina. Sampel yang berasal dari saluran pernafasan bagian atas atau dari organ – organ vital pada pasien yang sudah meninggal dunia dapat diambil pada kasus yang ekstrim dimana otopsi diperlukan untuk menegaskan kematian yang disebabkan oleh difteri.

B. PENGAMBILAN SPESIMEN

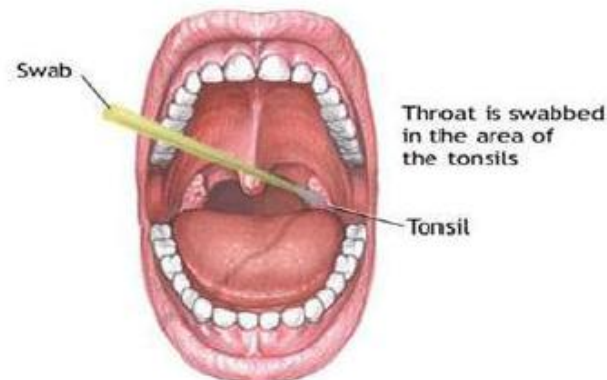
Dalam mengambil spesimen pada area faring harus berhati-hati terutama daerah yang pucat, ulserasi, dan kripta tonsilar. Usap nasofaring pada daerah inflamasi atau biakan usap pseudomembran dilakukan untuk diagnosis difteri. Alat yang digunakan untuk mengambil spesimen adalah dacron swab.

1. Alat dan bahan pengambilan spesimen

- a. dokumen
formulir permintaan pemeriksaan laboratorium dari dokter yang merawat atau dinas kesehatan provinsi/kabupaten (Form W1) atau surat permintaan pengambilan spesimen dari dinas kesehatan provinsi/kabupaten)
- b. investigasi KIT untuk pengambilan spesimen lapangan (tas ransel, alat tulis, *global positioning system*, senter, dan jas hujan)
- c. alat pelindung diri lengkap (masker, sarung tangan, jas lab, penutup kepala)
- d. swab kapas steril dengan tangkai poliester
- e. media transport amies
- f. spatula lidah

- g. saline steril (untuk membersihkan luka pada pengambilan usap luka)
 - h. lampu senter
 - i. kantong biohazard
 - j. desinfektan (alkohol 70%)
2. Labeling spesimen (pemberian label/etiket)
- Label/etiket ini di tempel pada tabung transport media amies dan data yang ditulis di buku log antara lain:
- a. nomor
 - b. nama penderita
 - c. umur
 - d. jenis kelamin
 - e. jenis spesimen
 - f. tanggal/jam pengambilan
 - g. lokasi (nama tempat pengambilan)
 - h. kolektor (petugas pengambil)
 - i. jenis pemeriksaan
3. Cara pengambilan usap hidung/nasofaring:
- a. Siapkan transport media amies (yang sudah diberi label identitas penderita) dan kapas *swab* steril.
 - b. Penderita duduk (kalau anak-anak dipangku) atau tidur, kepala ditengadahkan sampai muka menghadap ke atas, petugas berdiri di samping penderita dan memegang bagian belakang kepala penderita.
 - c. Masukkan swab kapas ke dalam lubang hidung bagian luar nares anterior usapkan dengan memutar swab kapas secara merata sepanjang rongga hidung sampai dinding faring, diamkan 2-3 detik agar cairan meresap ke kapas. Jangan menekan kapas swab pada lubang hidung apabila dirasa ada sumbatan.
 - d. Selanjutnya tarik kapas swab keluar dengan hati-hati dan masukkan ke dalam hidung satunya dengan urutan yang sama.
 - e. Masukkan ke dalam media transport amies.
4. Cara pengambilan usap tenggorok:
- a. Siapkan transport media amies (yang sudah diberi label identitas penderita) dan swab kapas steril.

- b. Penderita duduk (kalau anak-anak dipangku) atau tidur, kepala ditengadahkan sampai muka menghadap ke atas.
- c. Penderita diminta membuka mulut, pastikan bahwa faring jelas terlihat dan lidah ditekan dengan spatula lidah.
- d. Masukkan swab kapas steril dan usap pada bagian yang diduga yakni antara jaringan sehat dengan membran berwarna putih.
- e. Apabila tidak ada membran, masukkan swab kapas steril hingga menyentuh dinding belakang faring, usap ke kiri dan kanan pada dinding faring dan tonsil.
- f. Tarik keluar dengan hati-hati, tanpa menyentuh bagian mulut yang lain.
- g. Masukkan swab kapas ke dalam media transport amies.



Gambar 1. Swab tenggorok

5. Cara pengambilan usap luka :
 - a. Siapkan transport media amies (yang sudah diberi label identitas penderita) dan swab kapas steril.
 - b. Bersihkan luka terlebih dahulu menggunakan salin steril.
 - c. Usapkan lidi kapas dengan kuat pada area luka.
 - d. Masukkan swab kapas ke dalam media transport amies.

C. PENANGANAN SPESIMEN

Spesimen usap faring dan nasofaring sebaiknya segera dikirim ke laboratorium untuk diperiksa (dalam waktu 2 jam). Apabila ditunda, maka spesimen di dalam media transport harus disimpan pada suhu 2-4°C di lemari es (*refrigerator*). Sampel harus segera dikirim ke laboratorium dalam waktu kurang dari 24 jam.

D. PENGEMASAN SPESIMEN

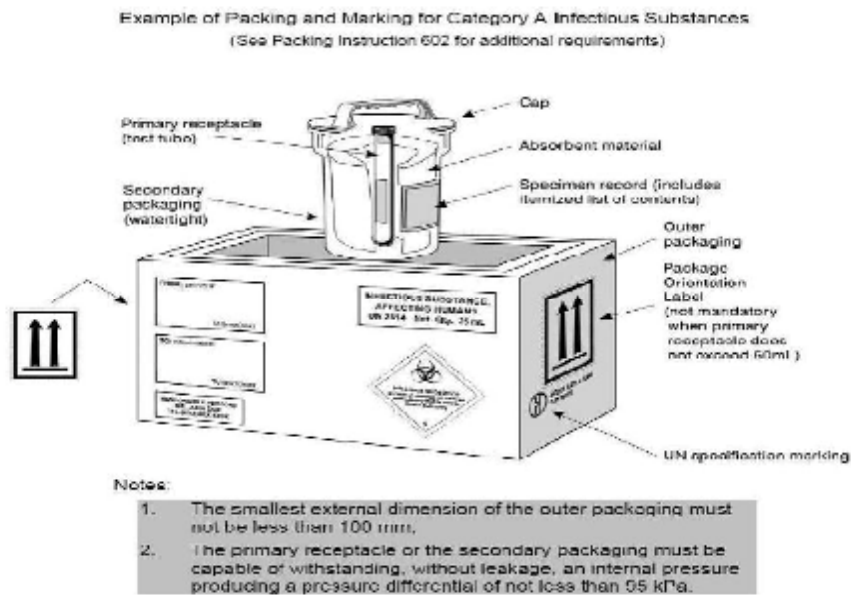
Spesimen atau isolat yang dirujuk atau dikirim ke laboratorium rujukan untuk pemeriksaan difteri, harus dapat menjamin keselamatan dan keamanan spesimen sampai ke laboratorium rujukan. Spesimen atau isolat harus dikemas sesuai prosedur dan standar yang telah ditentukan, sehingga spesimen atau isolat sampai di laboratorium rujukan hingga pada saat harus diperiksa dengan kualitas yang dapat dipertahankan baik. Selain kualitas spesimen, pengemasan juga harus mampu menjamin keselamatan petugas dan pihak terkait dari bahaya tertular infeksi difteri dari spesimen atau isolat yang dikirim.

Sesuai dengan standar WHO, pengemasan spesimen atau isolat difteri menggunakan 3 (tiga) lapis kemasan, dengan prosedur sebagai berikut:

1. Kotak pengiriman sebaiknya terdiri dari 2 buah kemasan yang berfungsi sebagai kemasan primer dan kemasan sekunder. Kemasan tersebut kemudian dimasukkan dalam kotak pengiriman yang bagian luarnya diberi label alamat pengirim dan alamat yang dituju dengan lengkap, dan label tanda jangan dibalik.
2. Tutup tabung amies media yang berisi usap tenggorok dan usap hidung masing-masing dilapisi dengan parafilm.
3. Masing-masing tabung dibungkus tisu kemudian dimasukkan dalam kantong plastik klip atau dapat disusun rapi posisi tegak lurus, spesimen kemudian dimasukkan dalam kemasan primer yang terbuat dari bahan *stainless steel*/wadah terbuat dari plastik (tidak disarankan menggunakan bahan yang terbuat dari paralon, karena bahan ini tidak dapat ditembus suhu dingin). Diusahakan jangan ada celah diantara tabung.
4. Kemasan primer kemudian disusun rapi dalam *cool box* yang menjadi kemasan sekunder dan sekelilingnya diberi *ice pack* (pengiriman spesimen difteri sebaiknya pada suhu dingin 2-8°C). Antara kemasan primer dan kemasan sekunder sebaiknya diberi sekat dengan kertas koran/stereo form untuk menghindarkan benturan selama perjalanan. Waktu pengemasan harus diperhatikan posisi spesimen (bagian atas dan bawahnya), jangan sampai terbalik.
5. Kemasan sekunder kemudian dimasukkan ke dalam *kotak* bagian luar yang telah diberi label alamat pengirim dan *alamat* yang dituju dengan lengkap, dan label tanda jangan dibalik.

- 6. Disertakan juga dokumen pendukung data formulir kontak dan data nvestigasi serta formulir W1

Contoh pengepakan menurut WTC).



Untuk pengemasan dan pengiriman spesimen difteri dapat juga dilakukan dengan menyesuaikan kondisi yang ada tanpa mengurangi prinsip makna pengiriman spesimen tersebut seperti contoh di bawah ini.

II. PENGIRIMAN SPESIMEN

Jrntuk pengiriman spesimen, pilihlah kargo atau jasa pengiriman yang dapat dipercaya baik dari segi keselamatan dan ketepatan waktu untuk sampai di tempat tujuan. Makin cepat sampai makin baik spesimen untuk diperiksa. Akan lebih baik lagi jika spesimen dibawa oleh petugas sendiri, karena setiap saat kita dapat mengawasinya. Setiap pengiriman spesimen harus selalu disertai data-data penunjang spesimen seperti nama, lokasi pengambilan, alamat, dan tanggal pengambilan.

BAB III MEDIA DAN REAGENSIA

Penyediaan kebutuhan media dan reagensia untuk pemeriksaan biakan *C. diphtheriae* sangat ditentukan oleh tindakan persiapan sebelumnya dan beberapa tindakan siap jadi. Mutu dari media dan reagensia ditentukan sejak stok bahan baku dipesan, penyimpanan bahan baku, pembuatan sampai penyimpanan setelah jadi.

A. JENIS MEDIA DAN REAGENSIA

Pemeriksaan difteri dapat dilakukn dengan beberapa metode yang memerlukan berbagai macam media dan reagensia, yaitu:

1. Amies Transport Media dengan *charcoal*
2. Amies Transport Media tanpa *charcoal*
3. Media *Hoyle's*
4. Media Agar darah columbia
5. *Telurite Blood Agar*
6. Media Tinsdale
7. Media Urea
8. *Pyrazinamidase Solution*
9. Nitrat Broth
10. HISS Serum *Water Carbohydrate Media*
11. Pewarna Gram
12. Pewarna Albert's
13. Pewarna Neisser's

B. PROSEDUR PEMBUATAN MEDIA DAN REAGENSIA

1. Amies Transport Media dengan *charcoal* (Untuk pembuatan 1 L)
 - a. Alat :
 - 1) Autoclave
 - 2) Cawan petri steril
 - 3) Timbangan analitik
 - 4) Erlenmeyer
 - 5) Kertas pH
 - 6) Gelas ukur
 - 7) Botol screw cap/botol vial + tutup volume 10 ml

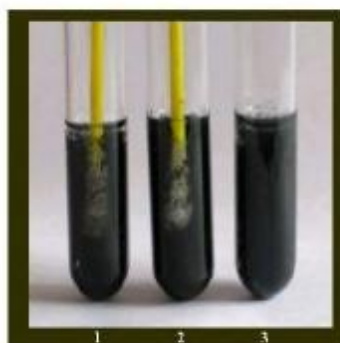
b. Bahan :

- 1) Amies Transport Media Cat. No. CM425
- 2) Aquadest
- 3) Agar

c. Prosedur :

- 1) Timbang 20 gram amies transport media dan 1 gram agar, kemudian larutkan dalam 1000 mL aquadest dengan cara dipanaskan hingga mendidih
- 2) Cek pH media yang telah larut (pH 7,3 ± 0,2)
- 3) Bagikan kedalam botol - botol tutup ulir berkapasitas 10 ml hingga mencapai ketinggian $\frac{3}{4}$ botol, tutup dengan rapat
- 4) Sterilkan media menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit

Gambar media amies dengan *charcoal*



Keterangan gambar :

No 3 : Media amies yang belum berisi sampel

No 1&2 : Media amies yang sudah berisi spesimen usap tenggorok/usap hidung

2. Amies Transport Media tanpa *charcoal* (Untuk pembuatan 1 L)

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Cawan petri steril
- 3) Timbangan analitik
- 4) Erlenmeyer
- 5) Kertas pH
- 6) Gelas ukur
- 7) Botol screw cap/botol vial + tutup volume 10 mL

b. Bahan :

Komposisi	gram/L
Sodium chlorida	3,0 g
Potasium Chlorida	0,2 g
Calcium Clorida	0,1 g
Magnesium Clorida	0,1 g
Monopotasium Clorida	0,2 g
Disodium Phospat	1,15 g
Bacto Agar	4,0 g
Sodium Thioglycolate	1,0 g
Aquadest	1 L

c. Prosedur :

- 1) Timbang semua bahan di atas kemudian larutkan dalam 1 L aquadest dengan cara dipanaskan hingga mendidih
- 2) Cek pH media yang telah larut (pH 7,3 ± 0,2)
- 3) Bagikan ke dalam botol-botol tutup ulir berkapasitas 10 mL hingga mencapai ketinggian $\frac{3}{4}$ botol, tutup dengan rapat
- 4) Sterilkan media menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Gambar media amies:



1 2

Ket :

Nomor 1 : media agar yang belum berisi sampel

Nomor 2 : media amies yang sudah berisi spesimen usap tenggorok/usap hidung

3. Media Hoyle's (Untuk pembuatan 1 L)

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Cawan petri steril

- 3) Timbangan analitik
 - 4) Erlenmeyer
 - 5) Kertas pH
 - 6) Gelas ukur
- b. Bahan :
- 1) Oxoid Hoyles Media Base
 - 2) Darah domba yang dilisiskan
 - 3) Potassium telurite 2%
 - 4) Aquadest
- c. Prosedur :
- 1) Cara melisiskan darah domba defibrinasi: letakkan darah domba defibrinasi di dalam *freezer* selama minimal 1 hari, ketika akan digunakan keluarkan darah domba yang sudah beku, dicairkan dalam suhu ruang kemudian divortek
 - 2) Timbang Oxoid Hoyle's Media Base sebanyak 40 g kemudian larutkan dalam 1000 ml *aquadest* dengan cara dipanaskan hingga mendidih
 - 3) Cek pH media yang telah dilarutkan (pH 7,8±0,2)
 - 4) Sterilkan media dengan suhu 121°C selama 15 menit
 - 5) Dinginkan media yang telah disterilkan hingga mencapai suhu 50-55°C
 - 6) Tambahkan secara steril 25 mL darah domba yang dilisiskan dan 16 mL Potassium Tellurite 2%
 - 7) Tuangkan ke dalam *petridisk* steril masing-masing sebanyak 20 mL

Gambar media Hoyle's :



4. Media Agar darah columbia (Untuk pembuatan 1 L)
 - a. Alat :
 - 1) Autoclave

- 2) Cawan petri steril
 - 3) Timbangan analitik
 - 4) Erlenmeyer
 - 5) Kertas pH
 - 6) Gelas ukur
- b. Bahan :
- 1) Agar darah columbia base
 - 2) Darah domba defibrinasi
 - 3) Aquadest
- c. Prosedur :
- 1) Timbang Agar darah columbia Base sebanyak 39 gram kemudian larutkan ke dalam 1000 mL aquadest dengan cara dipanaskan hingga mendidih
 - 2) Cek pH media yang telah dilarutkan (pH $7,3 \pm 0,2$)
 - 3) Sterilkan media menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit
 - 4) Dinginkan media yang telah disterilkan hingga mencapai suhu $50-55^{\circ}\text{C}$
 - 5) Tambahkan secara steril 50 ml darah domba defibrinasi
 - 6) Tuangkan kedalam petridisk steril masing-masing sebanyak 15-17 mL

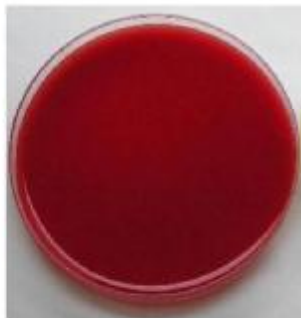
Gambar media Columbia Blood Agar :



5. Telurite Blood Agar

- a. Alat:
- 1) Autoclave
 - 2) Cawan petri steril
 - 3) Timbangan analitik

- 4) Erlenmeyer
 - 5) Kertas pH
 - 6) Gelas ukur
- b. Bahan:
- 1) media base agar darah
 - 2) air suling
 - 3) kalium tellurite
 - 4) cysteine
 - 5) asam klorida 5%
- c. Prosedur:
- 1) Larutkan 36 gram (lihat petunjuk pabrikan) media base agar darah dengan 900 mL air suling
 - 2) Panaskan agar semua larut secara homogen sambil mengaduk perlahan
 - 3) Sterilkan agar menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C, kemudian dinginkan pada temperatur kamar sampai media mencapai suhu 45-50°C
 - 4) Timbang 0.3 g kalium tellurite dan larutkan ke dalam 100 mL air suling, kemudian sterilkan dengan menggunakan autoclave selama 15 menit
 - 5) Timbang 22 mg cystine dan masukkan ke dalam tabung, setelah itu larutkan dengan 2 tetes asam klorida 5 %, kocok dan biarkan hingga larut
 - 6) Media agar base darah yang telah disteril dan didiamkan sampai mencapai suhu 45-50 °C ditambahkan 50 mL darah domba, kemudian tambahkan cystine yang terlarut dan tambahkan juga 75 mL kalium tellurite, homogenkan dengan cara mengocok secara perlahan kemudian tuang ke dalam petridisk sebanyak 15-20 mL.



6. Media Tinsdale (Untuk pembuatan 200 ml)

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Cawan petri steril
- 3) Timbangan analitik
- 4) Erlenmeyer
- 5) Kertas pH
- 6) Gelas ukur

b. Bahan :

- 1) Tinsdale Agar Base 200 mL
- 2) Difco Tinsdale Supplement 15 mL (1 vial + 15 aquadest steril)
- 3) Aquadest

c. Prosedur :

- 1) Timbang Tinsdale Agar Base sebanyak 9 gram secara steril kemudian larutkan ke dalam 200 mL aquadest steril dengan cara dipanaskan hingga mendidih
- 2) Cek pH media yang telah dilarutkan ($\text{pH } 8,0 \pm 0,2$), dinginkan media pada temperatur kamar sampai media mencapai suhu 55°C
- 3) Tambahkan 15 mL Difco Tinsdale Supplement, hindari terjadi gelembung udara
- 4) Tuangkan ke dalam 10 plate masing-masing 20 mL.

Gambar media tinsdale:



Catatan :

- Tinsdale media plate yang sudah jadi, maksimal dapat digunakan untuk menumbuhkan kuman dalam jangka waktu 5 hari.
- Pada pembuatan media, diusahakan seluruh peralatan yang digunakan sudah steril.

7. Media Urea (Untuk pembuatan 1000 L)

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Tabung bertutup ulir
- 3) Timbangan analitik
- 4) Kertas pH
- 5) Gelas ukur

b. Bahan :

- 1) Pepton
- 2) NaCl
- 3) KH₂PO₄
- 4) Glukose
- 5) Bacto Agar

c. Prosedur :

- 1) Timbang Pepton sebanyak 1 g, NaCl sebanyak 5 g, KH₂PO₄ sebanyak 2 g, Glukose sebanyak 1 g, Bacto agar sebanyak 20 g.
- 2) Larutkan semua bahan diatas dalam 1000 mL aquadest dengan cara dipanaskan sampai mendidih
- 3) Tambahkan indikator phenol red bagikan pada erlemenyer steril @100 ml. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, Agar ini dapat disimpan sebagai basal media.
- 4) Buat 10 mL larutan urea 20% (2 mg dilarutkan dalam 10 mL aquadest), kemudian sterilkan dengan cara memfilter larutan menggunakan membran filter 0,45 µl.
- 5) Tambahkan 10 mL larutan urea 20% pada basal media 100 mL kemudian homogenkan. Jika basal media sudah memadat, maka harus terlebih dahulu dicairkan dengan cara diletakkan dalam waterbath hingga mencair sempurna. Dinginkan basal media hingga mencapai suhu 50°C baru kemudian tambahkan larutan urea seperti ketentuan di atas.
- 6) Bagikan ke dalam tabung bertutup ulir steril dan miringkan 30°C.

Gambar media urea:



8. Pyrazinamidase Solution (Untuk pembuatan 100 mL)

a. Alat :

- 1) Tabung steril bertutup rapat
- 2) Timbangan analitik
- 3) Gelas ukur

b. Bahan :

- 1) Sigma Ref P7136
- 2) Aquadest

c. Prosedur :

- 1) Timbang 200 mg reagen Pyrazinamidase (Sigma Ref P7136)
- 2) Larutkan dalam 100 mL aquadest
- 3) Lakukan sterilisasi dengan cara memfilter larutan menggunakan membran filter 0,45 μ l
- 4) Bagi PYZ solution ke dalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 0,25 mL
- 5) Simpan di suhu -20°C
- 6) Sebelum digunakan, kondisikan reagen dalam suhu ruang

Gambar Pyrazinamidase solution :



9. Nitrat Broth (Untuk pembuatan 100 mL)

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Tabung steril bertutup rapat
- 3) Timbangan analitik
- 4) Gelas ukur

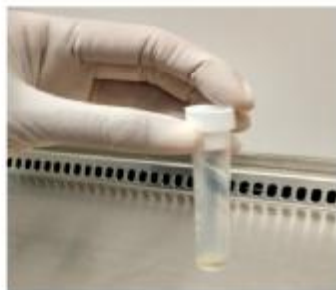
b. Bahan :

- 1) Nutrient Broth No.2 Oxoid CM67
- 2) Potassium Nitrate (KNO_3)
- 3) Aquadest

c. Prosedur :

- 1) Timbang 2,5 g Nutrient Broth No.2 Oxoid CM67
- 2) Timbang 0,1 g potassium nitrate
- 3) Larutkan dalam 100 mL aquadest
- 4) Lakukan sterilisasi dengan cara autoclave selama 10 menit pada suhu 115°C
- 5) Bagi Nitrate solution kedalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 0,25 mL
- 6) Simpan di suhu -20°C
- 7) Sebelum digunakan, kondisikan reagen dalam suhu ruang.

Gambar nitrat broth :



10. HISS Serum Water Carbohydrate Media

a. Alat :

- 1) Autoclave
- 2) Tabung reaksi steril
- 3) Timbangan analitik
- 4) Erlenmeyer
- 5) Kertas pH
- 6) Gelas ukur

b. Bahan :

- 1) disodium phosphate (Na_2HPO_4)
- 2) Peptone
- 3) Aquadest
- 4) Larutan Glukosa 4%
- 5) Larutan Sukrosa 4%
- 6) Larutan Maltosa 4%
- 7) Larutan Starch 3%

c. Prosedur :

- 1) Buat larutan base media dengan cara: timbang 1 gram disodium phosphate (Na_2HPO_4)
- 2) Phosphate dan 5 gram peptone, larutkan dalam 1000 mL aquadest dengan cara dipanaskan tidak boleh sampai mendidih.
- 3) Cek pH media yang telah dilarutkan (pH 7,4)
- 4) Tambahkan serum kuda sebanyak 250 mL. Panaskan dengan uap selama 3-5 menit suhu 95-100°C
- 5) Tambahkan 11 mL BTB 0,4%
- 6) Bagikan dalam erlenmeyer @100 mL kemudian sterilkan suhu 121°C selama 10 menit
- 7) Pada masing – masing base media 100 mL, tambahkan larutan karbohidrat yang telah disteril menggunakan membran filter 0,45 µl :
 - a) Media Glukosa : 100 mL base media + 10 mL Lar. Glukosa 4% steril
 - b) Media Sukrosa : 100 mL base media + 10 mL Lar. Sukrosa 4% steril
 - c) Media Maltosa : 100 mL base media + 10 mL Lar. Maltosa 4% steril
 - d) Media Starch : 100 mL base media + 5 mL Lar. Starch 3% steril
- 8) Bagikan pada tabung – tabung reaksi steril masing – masing 5 mL

Gambar HISS Serum Water Carbohydrate Media :



11. Pewarna Gram

a. Alat :

- 1) Timbangan analitik
- 2) Gelas ukur
- 3) Mortir
- 4) Batang pengaduk
- 5) Botol coklat untuk menyimpan larutan pewarna yang sudah jadi

b. Bahan :

- 1) Gram A (kristal violet) :
 - a) kristal violet
 - b) ethanol 95%
 - c) amonium oxalat
 - d) *aquadest*
- 2) Gram B (lugol/iodine) :
 - a) iodine kristal
 - b) potasium iodide
 - c) *aquadest*
- 3) Gram C (Peluntur) :
 - a) alkohol 96%
- 4) Gram D (Safranin) :
 - a) Safranin O
 - b) ethanol 95%

c. Prosedur :

1) Pembuatan Larutan Gram A :

- a) Timbang kristal violet sebanyak 2 g kemudian larutkan dalam 20 mL ethanol 95% (Larutan 1)
- b) Timbang 0,8 g amonium oxalat kemudian larutkan dalam 80 mL *aquadest*
- c) Campurkan larutan A dan larutan B, simpan selama 24 jam sebelum digunakan
- d) Tempatkan larutan yang sudah jadi dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

2) Pembuatan Larutan Gram B :

- a) Timbang Iodine kristal sebanyak 1 g dan potassium iodide sebanyak 2 g
- b) Gerus kristal dalam mortir
- c) Tambahkan *aquadest* sedikit demi sedikit hingga iodine larut
- d) Tempatkan larutan yang sudah jadi dalam botol coklat, beri identitas tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

3) Pembuatan Larutan Gram C :

Simpan larutan alkohol 96% secukupnya dalam botol bertutup rapat supaya alkohol tidak mudah menguap

4) Pembuatan Larutan Gram D :

- a) Timbang Safranin O sebanyak 2,5 g kemudian larutkan dalam 100 mL ethanol 95% (Larutan Stok)
- b) Encerkan 10 mL larutan stok dengan 90 mL *aquadest*
- c) Tempatkan larutan yang sudah jadi dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat.

Gambar pewarna Gram



Kristal Violet dan Iodine Alkohol 96% dan Safranin

Catatan : hanya sebagai gambar contoh diletakan dalam botol bening, untuk penyimpanan jangka panjang harus ditempatkan dalam botol coklat]

12. Pewarna Albert's

a. Alat :

- 1) Timbangan analitik
- 2) Gelas ukur
- 3) Mortir
- 4) Batang pengaduk
- 5) Botol coklat untuk menyimpan Larutan pewarna yang sudah jadi

b. Bahan :

- 1) Larutan Albert's I :
 - a) Toluidine blue
 - b) Malachite green
 - c) asam acetat glacial
 - d) alkohol 95%
 - e) aquadest
- 2) Larutan Albert's II :
 - a) iodine
 - b) potassium iodide
 - c) aquadest

c. Prosedur :

- 1) Pembuatan Larutan Albert's I :

- a) Timbang Toluidine blue sebanyak 0,15 g; Malacite green sebanyak 0,20 g kemudian gerus kristal dalam mortir
 - b) Tambahkan asam acetat glacial sebanyak 1 ml dan alkohol 95% sebanyak 2 ml
 - c) Tambahkan 100 ml aquadest
 - d) Diamkan selama 24 jam, kemudian saring dan tempatkan dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat
- 2) Pembuatan Larutan Gram B :
- a) Timbang Iodine sebanyak 2 gr dan potassium iodide sebanyak 3 gr kemudian gerus kristal dalam mortir
 - b) Larutkan dalam 300 mL aquadest, saring dengan kertas saring
 - c) Tempatkan dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

13. Pewarna Neisser's

a. Alat :

- 1) Timbangan analitik
- 2) Gelas ukur
- 3) Batang pengaduk
- 4) Botol coklat untuk menyimpan Larutan pewarna yang sudah jadi

b. Bahan :

- 1) Larutan A :
 - a) Methylene blue
 - b) Ethanol 95%
 - c) Asam acetat glacial
 - d) *Aquadest*
- 2) Larutan B :
 - a) Kristal violet
 - b) Ethanol 95%
 - c) *Aquadest*
- 3) Larutan C :
 - a) Crysoidin/visuvine/bismark brown
 - b) *Aquadest*

c. Prosedur :

1) Pembuatan Larutan A:

- a) Pipet Methylene blue sebanyak 0,1 mL
- b) Tambahkan 100 mL aquadest, tambahkan ethanol 95% sebanyak 5 mL dan asam acetat glacial sebanyak 5 mL
- c) Tempatkan dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

2) Pembuatan Larutan B :

- a) Timbang kristal violet sebanyak 0,33 g, tambahkan 3,3 mL ethanol 95%
- b) Tambahkan 100 mL *aquadest*
- c) Tempatkan dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

3) Pembuatan Larutan C :

- a) Timbang Crysoidin/visuvine/bismark brown sebanyak 1 g, larutkan dalam 300 mL *aquadest*
- b) Tempatkan dalam botol coklat, beri label tanggal pembuatan dan petugas yang membuat

Gambar :



Neisser A dan Neisser B



Neisser C

Catatan :

hanya sebagai contoh diletakkan dalam botol bening, untuk penyimpanan jangka panjang harus ditempatkan dalam botol coklat.

BAB IV PEMERIKSAAN

A. PEMERIKSAAN MIKROSKOPIS

1. Metode

Pemeriksaan mikroskopis untuk difteri terdiri dari pewarnaan Gram, pewarnaan Albert, dan pewarnaan Neisser. Spesimen yang telah diambil selanjutnya dilakukan pewarnaan tersebut di atas. Tujuan masing-masing pewarnaan berbeda. Pewarnaan Gram untuk melihat sifat Gram dan morfologi bakteri sedangkan pewarnaan Albert dan Neisser untuk melihat granula metakromatik pada *Corynebacterium*.

2. Prinsip Pemeriksaan

Pemeriksaan mikroskopis tidak dapat dipakai untuk diagnosis karena tidak dapat membedakan *Corynebacterium* patogen dengan *Corynebacterium* non patogen yang merupakan bagian dari flora normal saluran pernapasan atas.

Secara umum, membedakan strain dengan pewarnaan tersebut di atas tidak mungkin dilakukan. Semua strain akan memiliki bentuk pleiomorfik antara lain seperti tongkat pemukul drum, halter dan tersusun palisade atau seperti huruf Cina. Pewarnaan Albert khusus untuk melihat granula metakromatik atau volutin. Dengan pewarnaan ini, organisme akan berwarna hijau dengan granula berwarna gelap. Dengan pewarnaan Neisser, granula akan terlihat berwarna biru gelap. Pemeriksaan ini tidak dapat dipakai untuk penegakkan diagnosis karena sebagian besar spesies *Corynebacterium* memproduksi granula metakromatik. Walaupun pada suspek difteri penemuan granula tersebut harus dilaporkan, namun disarankan untuk tidak melakukan pewarnaan pada usap tenggorok untuk diagnosis difteri. Hal tersebut dikarenakan terdapat difteroid non patogen yang dapat mengarah pada diagnosis yang salah.

3. PROSEDUR

a. Pembuatan Sediaan

1) Spesimen:

Usap tenggorok, usap hidung atau usap luka dalam media transport amies

2) Alat:

a) Gelas objek

- b) Bunsen
- c) Spidol
- 3) Prosedur:
 - a) Label gelas objek sesuai dengan kode pasien
 - b) Usapkan kapas *swab* steril dalam media amies di atas objek *glass*
 - c) Keringkan sediaan pada suhu ruang
 - d) Fiksasi di atas bunsen sebanyak 3 kali
 - e) Sediaan siap diwarnai
- b. Pewarnaan
 - 1) Pewarnaan Gram
 - a) Bahan:
Sediaan yang sudah difiksasi
 - b) Reagen:
 - (1) Larutan Gram A (kristal violet)
 - (2) Larutan Gram B (iodine/lugol)
 - (3) Larutan Gram C (alkohol 96%)
 - (4) Larutan Gram D (safranin)
 - c) Prosedur:
 - (1) Genangi sediaan dengan larutan Gram A (kristal violet) dan diamkan selama 1 menit, kemudian bilas kuat dengan larutan Gram B (iodine/lugol)
 - (2) Genangi sediaan dengan larutan Gram B (iodine/lugol) dan diamkan selama 1 menit
 - (3) Bilas dengan air mengalir
 - (4) Genangi dengan alkohol 96% selama 15 detik kemudian bilas dengan air mengalir
 - (5) Genangi dengan larutan safranin selama 30 detik kemudian bilas dengan air mengalir dan keringkan di udara
 - (6) Setelah kering melihat sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X menggunakan minyak imersi
 - d) Interpretasi Hasil:
 - (1) Gram positif: Bakteri akan berwarna ungu, bentuknya jelas batang atau coccus

- (2) Gram negatif: Bakteri akan berwarna merah, bentuknya jelas batang atau coccus
- 2) Pewarnaan Albert's
- a) Bahan:
Sediaan yang sudah difiksasi
- b) Reagen:
- (1) Larutan Albert's I
(2) Larutan Albert's II
- c) Prosedur:
- (1) Genangi sediaan dengan larutan Albert's I dan diamkan selama 2 menit, kemudian bilas dengan air mengalir
- (2) Genangi sediaan dengan larutan Albert's II dan diamkan selama 2 menit, kemudian bilas dengan air mengalir dan keringkan di udara
- (3) Setelah kering melihat sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X menggunakan minyak imersi
- d) Interpretasi Hasil:
- (1) Granula: akan terlihat biru kehitaman
(2) Badan bakteri: akan terlihat hijau atau hijau kebiruan
- 3) Pewarnaan Neisser's
- a) Bahan:
Sediaan yang sudah difiksasi
- b) Reagen:
- (1) Larutan A
(2) Larutan B
(3) Larutan C
- c) Prosedur:
- (1) Buat campuran larutan A dan B dengan perbandingan 2 : 1
- (2) Genangi sediaan dengan campuran larutan A dan B, diamkan selama 10 detik
- (3) Genangi sediaan dengan larutan C dan diamkan selama 30 detik, kemudian keringkan di bawah kertas saring

(4) Setelah kering melihat sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X menggunakan minyak imersi

d) Interpretasi hasil:

- (1) Granula: akan terlihat biru kehitaman
- (2) Badan bakteri: berwarna coklat muda

B. PEMERIKSAAN BIAKAN

1. Metode

Metode inokulasi yang digunakan adalah biakan pada media primer. Selanjutnya koloni yang tumbuh di lakukan uji skrining dan *biotipe* menggunakan metode konvensional atau semi otomatis tergantung dari fasilitas yang tersedia di laboratorium pemeriksa.

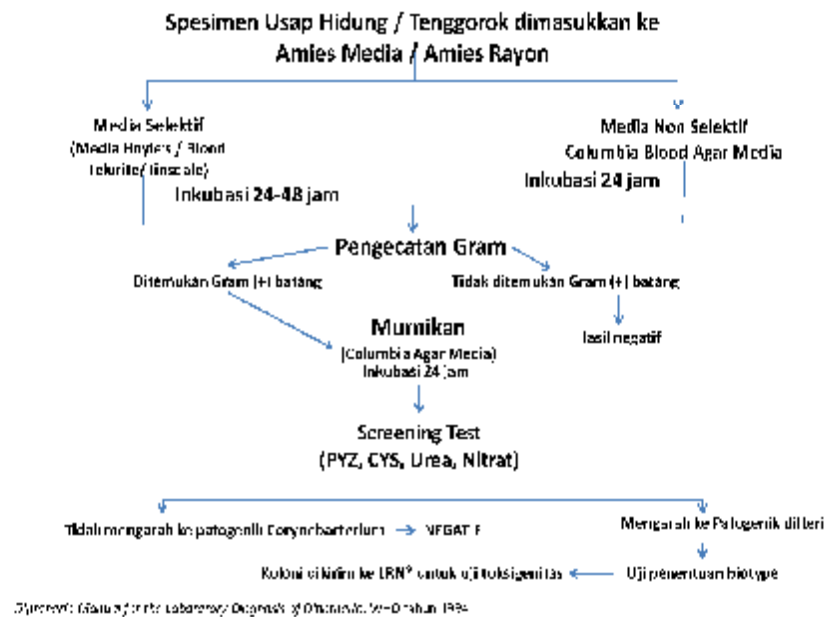
2. Prinsip

Usap tenggorok/usap hidung/usap luka diinokulasikan pada media primer. Media primer yang dapat digunakan adalah Agar darah columbia (media non-selektif), disertai dengan salah satu media selektif berikut ini: media *Hoyle's*, *Telurite Blood Agar*, dan media *Tinsdale*. Inkubasi pada Agar darah columbia dilakukan secara aerobik pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sedangkan inkubasi pada media *Hoyle's*, *Telurite Blood Agar*, dan media *Tinsdale* dilakukan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan koloni yang tumbuh pada masing-masing media. Apabila koloni tidak tumbuh, inkubasi diulang selama 24 jam. Pada koloni yang tumbuh dilakukan pengecatan Gram, jika didapatkan hasil Gram positif batang maka koloni tersangka tersebut di subbiakan pada media Agar darah columbia inkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan uji skrining pada koloni yang telah di subbiakan, jika hasil uji skrining mengarah pada patogenik *Corynebacterium* maka selanjutnya dilakukan uji *biotipe* untuk menentukan spesies dan varian *Corynebacterium*. Setelah didapatkan hasil spesies dan varian, selanjutnya isolat kuman dikirim ke laboratorium rujukan nasional untuk diuji toksigenitas dan molekuler.

Gambar 1. Skema pemeriksaan biakan *C. diphtheriae*

SKEMA PEMERIKSAAN BIAKAN *C. diphtheriae*



3. Prosedur

a. Inokulasi pada media primer

1) Spesimen:

Usap tenggorok/usap hidung/usap luka dalam media transport amies

2) Alat dan Bahan :

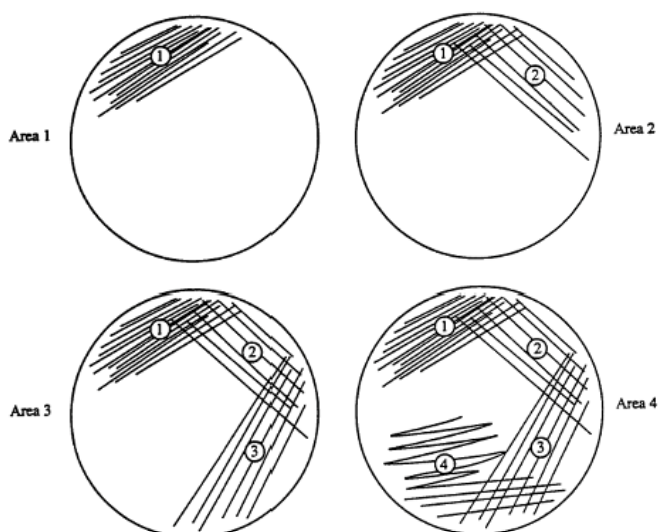
- a) Agar darah columbia
- b) *Telurite Blood Agar/media Hoyle's/media Tinsdale*
- c) Ose
- d) Bunsen

3) Prosedur :

- a) Beri label pada plat media yang akan digunakan sesuai dengan kode spesimen.
- b) Lakukan inokulasi spesimen dari media transport amies ke media non selektif Agar darah columbia disertai dengan salah satu dari media selektif berikut: media *Hoyle's*, *Blood Telurite Agar* atau media *Tinsdale*. Inkubasi Agar darah columbia (non selektif media)

pada suhu 37° C selama 18-24 jam dan media selektif pada suhu 37° C 24-48 jam.

- c) Inokulasi dilakukan dengan cara terlebih dahulu mengusapkan spesimen pada salah satu sisi media, selanjutnya dilakukan goresan seperti pada gambar dibawah ini.



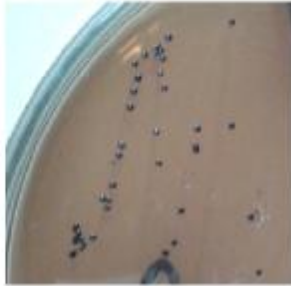
- d) Inkubasi Agar darah columbia pada suhu 37° C selama 18-24 jam, inkubasi media *Hoyle's*, *Blood Telurite Agar*, dan media *Tinsdale* pada suhu 37° C selama 24-48 jam.
- e) Amati koloni yang tumbuh sesuai dengan ciri di bawah ini

Jenis Media	Ciri Koloni
Agar darah columbia	Hitam atau abu-abu, kering, bulat
Media <i>Hoyle's</i>	Putih, creamy surface, bulat
<i>Blood Telurite Agar</i>	Putih, creamy surface, bulat
Media <i>Tinsdale</i>	Hitam dan ada zona bayangan hitam disekitar koloni

Gambar pertumbuhan koloni *C. diphtheriae* pada media
Agar darah columbia :



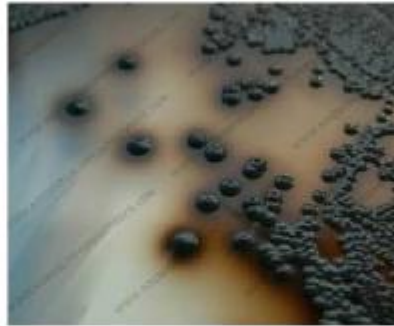
Gambar pertumbuhan koloni *C. diphtheriae* pada media
Hoyle's



Gambar pertumbuhan koloni *C. diphtheriae* pada media
blood tellurite agar



Gambar pertumbuhan koloni *C. diphtherias* pada media *tinsdale*



b. Uji Skrining

1) Alat dan bahan :

- a) Agar darah columbia
- b) Reagen pewarnaan Gram
- c) Pyrazinamidase Solution
- d) PYZ reagent-Ferrous ammonium sulphate 20% (tersedia secara komersial)
- e) Nitrat broth
- f) Nitrat 1 dan Nitrat 2 (tersedia secara komersial)
- g) Media urea agar
- h) Ose
- i) Bunsen
- j) Objek glass
- k) Mikroskop

2) Prosedur :

- a) Jika ditemukan koloni tersangka seperti gambar di atas, maka koloni tersebut selanjutnya dilakukan pengecatan Gram
- b) Jika pada pengecatan Gram ditemukan kuman Basil Gram Positif maka segera lakukan pemurnian. Jika ditemukan kuman selain Basil Gram Positif, maka hasil biakan dianggap negatif.
- c) Pemurnian dilakukan pada media agar darah Columbia, lalu inkubasi selama 1 x 24 jam

- d) Amati koloni yang tumbuh, lakukan kembali pewarnaan gram dan pastikan hasilnya tetap Basil Gram Positif.
- e) Koloni yang telah murni sebagai Basil Gram Positif, dilakukan uji skrining, uji skrining meliputi:

(1) Pyrazinamide Tes

Prosedur :

- (a) Pipet masing-masing 0,25 mL Pyrazinamidase solution masukkan dalam 3 tabung reaksi steril bertutup rapat
- (b) Buat suspensi kuman dengan cara mengambil koloni kuman yang telah dimurnikan pada media Agar darah columbia menggunakan ose steril kemudian campurkan pada Pyrazinamidase solution. Suspensi kuman harus cukup keruh hingga berwarna putih susu (minimal Mc Farland No. 8)
- (c) Siapkan kontrol positif (strain kuman *C. striatum* NCTC 764) dan kontrol negatif (strain kuman *C. ulcerans* NCTC 12077) menggunakan cara yang sama seperti di atas
- (d) Inkubasi suspensi kuman pada suhu 37°C selama 4 jam atau 18-24 jam
- (e) Teteskan 1 tetes Ferrous ammonium sulphate 20% ke dalam suspensi kuman (tersedia produk komersial PYZ dari biomerieux)
- (f) Amati perubahan warna yang terjadi

Pembacaan hasil:

- Positif : merah / orange
- Negatif : tidak terjadi perubahan warna

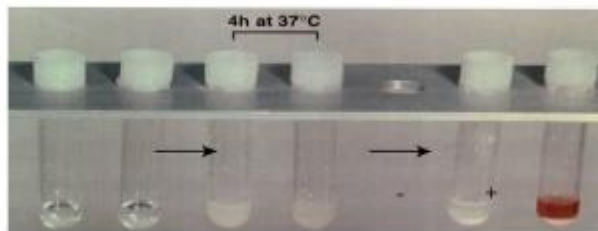
Interpretasi hasil :

- Positif : *Corynebacterium* non patogen
- Negatif : *Corynebacterium* patogenik (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis*)

Kontrol kualitas :

- *Corynebacterium striatum* NCTC 764
- *Corynebacterium ulcerans* NCTC 12077

Gambar : Pyrazinamidase Test



(2) Reduksi Nitrat Tes

Prosedur :

- (a) Pipet masing-masing 0,25 mL Nitrat broth masukkan dalam 3 tabung reaksi steril bertutup rapat
- (b) Buat suspensi kuman dengan cara mengambil koloni kuman yang telah disubbiakan pada media Agar darah columbia menggunakan ose steril kemudian campurkan pada Nitrat broth. Suspensi kuman harus cukup keruh hingga berwarna putih susu (minimal Mc Farland No.8)
- (c) Siapkan kontrol positif (strain kuman *C. striatum* NCTC 764) dan kontrol negatif (strain kuman *C. ulcerans* NCTC 12077) menggunakan cara yang sama seperti di atas
- (d) Inkubasi suspensi kuman pada suhu 37°C selama 4 jam atau 18-24 jam
- (e) Teteskan 1 tetes reagen nitrat 1 dan 1 tetes reagen nitrat 2 (tersedia produk komersial nitrat dari biomerieux)
- (f) Amati perubahan warna yang terjadi

Pembacaan hasil :

- Positif : merah
- Negatif : tidak terjadi perubahan warna

Kontrol kualitas :

- *Corynebacterium striatum* NCTC 764
- *Corynebacterium ulcerans* NCTC 12077

Gambar : Reduksi Nitrat Tes



Keterangan:

- kiri : negatif
- kanan : positif

(3) Uji Urease

Prosedur:

- (a) Ambil koloni tersangka yang telah dimurikan pada medium Agar darah columbia lalu lakukan penanaman pada media urea
- (b) Siapkan kontrol positif (strain kuman *C. ulcerans* NCTC 12077) dan kontrol negatif (strain kuman *C. striatum* NCTC 764) menggunakan cara yang sama seperti di atas
- (c) Inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C
- (d) Amati perubahan warna yang terjadi

Pembacaan Hasil :

- Positif : merah muda
- Negatif : tidak terjadi perubahan warna

Kontrol kualitas :

- *Corynebacterium striatum* NCTC 764
- *Corynebacterium ulcerans* NCTC 12077

Gambar : Uji Urease



Keterangan: :

- Kiri : Negatif
- Kanan : Positif

(4) Uji Cystinase

Prosedur :

- (a) Ambil koloni tersangka yang telah dimurikan pada media Agar darah colombia.
- (b) Inokulasikan pada media *Tinsdale agar plate* pada media tinsdale dengan cara streaking tunggal.
- (c) Goreskan mata ose pada media tinsdale area streaking untuk memperjelas zona coklat yang terbentuk disekitar koloni.
- (d) Lakukan inokulasi kontrol positif (NCTC 12077) dan kontrol negatif (NCTC 764) menggunakan cara yang sama seperti di atas.
- (e) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- (f) Mengamati pertumbuhan koloni kuman dan zona coklat yang terbentuk.

Pembacaan Hasil :

- Positif : Koloni warna hitam dikelilingi oleh zona berwarna coklat
- Negatif : Koloni warna hitam tanpa dikelilingi zona berwarna coklat

Interpretasi hasil :

- Positif : *Corynebacterium* patogen (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis*)
- Negatif : *Corynebacterium* non patogen

Kontrol kualitas :

- *Corynebacterium striatum* NCTC 764
- *Corynebacterium ulcerans* NCTC 12077

Gambar Uji Cystinase



Gambar kanan menunjukkan hasil uji Cystinase positif, Gambar kiri menunjukkan hasil uji Cystinase negatif.

c. Uji Biotipe

Uji biotipe dapat dilakukan secara konvensional atau semi otomatis

- 1) Uji Biotipe Konvensional (Identifikasi *Corynebacterium* patogen)
 - a) Alat dan Bahan :
 - (1) Agar darah columbia
 - (2) HISS Serum Water Carbohydrate Media
 - (3) Ose
 - (4) Bunsen
 - b) Prosedur :
 - (1) Jika hasil uji skrining mengarah kepada *Corynebacterium* patogen (*C. diphtheriae*, *C. ulceran*

dan *C. pseudotuberculosis*) maka pemeriksaan dilanjutkan penentuan *biotipe* dengan menggunakan uji Gula-gula Hiss Serum (dengan serum kuda) meliputi: Glukosa, Maltosa, Sukrosa, dan Glikogen/starch)

- (2) Ambil koloni tersangka yang telah dimurikan pada media agar darah Colombia menggunakan ose steril
- (3) Inokulasikan pada masing-masing tabung uji Gula-gula Hiss Serum
- (4) Lakukan inokulasi kontrol positif starch/glikogen (*C. diphtheriae* var. *gravis* NCTC 3984) dan kontrol negatif (*C. diphtheriae* var. *belfanti* NCTC 13056) menggunakan cara yang sama seperti di atas (hanya pada tabung starch/glikogen)
- (5) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam
- (6) Amati perubahan warna yang terjadi

c) Pembacaan Hasil :

- (1) Positif : terjadi perubahan warna menjadi kuning
- (2) Negatif : tidak terjadi perubahan warna

d) Kontrol kualitas :

- (1) *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* NCTC 3984
- (2) *Corynebacterium diphtheriae* var. *belfanti* NCTC 10356

e) Gambar uji Gula-gula Hiss Serum



NEGATIF

POSITIF

f) Interpretasi hasil :

BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF PATHOGENIC CORYNEBACTERIA

	CYS	PY Z	Nitr ate	Urea	Acid produced from					
					Glu cos e	Ri bo se	Mal tos e	Sucr ose	Glyc ogen	Treh alos e
<i>C. diphtheriae</i>										
<i>Var gravis</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	N/A
<i>Var mitis</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	N/A
<i>Var intermedius</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	N/A
<i>Var belfanti</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	N/A
<i>C. ulcerans</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	N/A
<i>C. xerosis</i>	-	+	+	-	+	±	+	+	-	N/A
<i>C. striatum</i>	-	+	+	-	+	V	-	V	-	N/A

2) Uji Biotipe Semi Otomatis (*Apy Coryne Test*)

a) Alat dan Bahan :

- *Apy Coryne Test Kit*
- Lidi kapas steril
- Bunsen

b) Prosedur :

- (1) Uji skrining dan *biotipe* dapat pula dilakukan dengan menggunakan produk komersial yang sudah jadi (*Apy Coryne Test*)
- (2) Beri label pada *tray* *apy coryne*, basahi *tray* dengan *aquadest* secukupnya. Letakkan *test medium* di atas *tray*
- (3) Ambil koloni tersangka yang telah dimurikan pada media Agar darah colombia menggunakan lidi

kapas steril, suspensikan pada “suspension medium” dengan kekeruhan diatas Mc Farland No. 6

(4) Inokulasikan suspensi pada ampul “suspension medium” menggunakan pipet tetes steril pada 11 lubang yang berada dalam *test medium* :

- NIT sampai GEL
- NIT sampai ESC : 6 tetes suspensi
- URE : tutup dengan mineral oil
- GEL : tetesi dengan suspensi hingga penuh

(5) Pindahkan sisa suspensi dari ampul “suspension medium” ke ampul yang berisi GP Medium kemudian homogenkan

(6) Inokulasikan suspensi pada ampul “GP Medium” menggunakan pipet tetes steril pada 9 lubang yang tersisa dalam *test medium* 0 sampai GLY, tutup dengan mineral oil.

- NIT sampai GEL
- NIT sampai ESC : 6 tetes suspensi

(7) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam

(8) Amati perubahan warna yang terjadi

c) Gambar Prosedur Uji biotipe semi otomatis (*Apy Coryne Test*) :



NEGATIF



POSITIF

d) Interpretasi Hasil



d. Rujukan Isolat

Jika identifikasi *Corynebacterium* patogen (*C. diphtheriae*/*C. ulcerans*/*C. pseudotuberculosis*) telah selesai dilakukan, maka isolat harus segera dikirim ke laboratorium rujukan nasional untuk pemeriksaan toksigenitas dan molekuler. Pengiriman isolat sebaiknya dilakukan pada suhu 2-8 °C untuk menjaga kestabilan bakteri.

1) Alat dan Bahan :

- a) Isolat murni dalam columbia agar
- b) Media transport amies
- c) Wadah plastik/ *stainles steel* (kemasan primer)
- d) *Cool box* (kemasan sekunder)
- e) Kotak luar
- f) Dokumen yang berisi data isolat yang dikirim (data hasil uji skrining, *biotipe* dan kesimpulan identifikasi spesies)

2) Prosedur :

- a) Siapkan isolat yang sudah murni dalam media columbia agar
- b) Ambil koloni bakteri secukupnya menggunakan swab kapas steril, masukkan dalam media transport amies
- c) Lakukan proses pengemasan dan pengiriman isolat rujukan menggunakan prosedur yang sama dengan prosedur pengemasan dan pengiriman spesimen pada BAB II Spesimen.

C. UJI TOKSIGENISITAS

Uji yang paling penting pada diagnosis mikrobiologis difteri adalah deteksi strain yang memproduksi toksin. Tidak semua isolat *C. diphtheriae* dapat memproduksi toksin. Signifikansi klinis dan epidemiologis *C. diphtheriae* non-toksigenik berbeda dengan yang tipe toksigenik. Oleh karena itu, penting untuk mendapatkan hasil yang akurat secepatnya sehingga dapat mengonfirmasi diagnosis difteri dan mengetahui penyebaran penyakit dengan identifikasi kontak yang mungkin karier.

Terdapat beberapa metode *in vitro* dan *in vivo* yang tersedia namun metode ini bergantung pada availabilitas sumber daya dan pengalaman staf laboratorium. Metode yang umumnya digunakan untuk menentukan toksigenisitas adalah uji imunopresipitasi Elek, yang saat ini sudah ditingkatkan. Uji tersebut menggunakan medium Elek yang dimodifikasi.

Uji toksigenisitas berupa uji Elek dan PCR dapat dilakukan di laboratorium rujukan.

BAB IV
KESELAMATAN DAN KEAMANAN KERJA LABORATORIUM

Keselamatan dan keamanan laboratorium adalah bagian penting pelayanan laboratorium. Keselamatan kerja laboratorium merupakan upaya untuk melindungi petugas laboratorium dan orang di sekitarnya dari risiko terkena gangguan kesehatan yang ditimbulkan dari laboratorium. Sedangkan keamanan laboratorium merupakan upaya keamanan yang diterapkan di tingkat perorangan dan institusional untuk mencegah kehilangan, pencurian, penyalahgunaan, penyimpangan atau pelapasan dengan sengaja organisme patogen, toksin atau data. Petugas laboratorium harus memiliki pemahaman akan pentingnya keselamatan dan keamanan di laboratorium.

Hal ini mutlak perlu diperhatikan karena mempunyai dampak kesehatan langsung bagi petugas laboratorium dan dampak kesehatan yang tidak/langsung terhadap masyarakat di lingkungan sekitarnya.

A. TINDAKAN PENCEGAHAN INFEKSI LABORATORIUM

1. Melindungi petugas dan pasien:
 - a. Alat Pelindung Diri (APD) selalu digunakan selama bekerja di laboratorium.
 - b. Menghindarkan penyebaran percikan bahan infeksi dari spesimen pada saat pelaksanaan pemeriksaan (misalnya penanaman spesimen dengan sengkeli dan pada saat pembakaran sengkeli di atas api).
 - c. Spesimen ditempatkan dalam wadah yang tahan bocor.
 - d. Melakukan dekontaminasi permukaan meja kerja dengan desinfektan yang sebelum dan sesudah bekerja.
 - e. Tangan dicuci sesering mungkin dengan sabun/desinfektan, tidak menyentuh mulut dan mata selama bekerja.
 - f. Tidak diperkenankan makan, minum dan merokok selama berada di laboratorium.
 - g. Melaporkan kepada Tim K3, apabila terjadi kecelakaan kerja di dalam laboratorium.
2. Disiapkan wadah yang diisi desinfektan untuk peralatan yang telah digunakan dan terkontaminasi bakteri.

3. Dilakukan sterilisasi yang benar sebelum mencuci alat atau membuang sisa spesimen.
4. Disediakan tempat pembuangan jarum suntik dan tisu atau kapas bekas pengambilan spesimen dan pasien.
5. Pakaian jas laboratorium dan sepatu kerja laboratorium mikrobiologi sebaiknya tidak dipakai di luar daerah kerjanya.

B. CARA MENGGUNAKAN ALAT DI LABORATORIUM

1. Cara menggunakan pipet dan alat bantu pipet
 - a. Dihindari memipet dengan mulut, sebaiknya selalu digunakan alat bantu pipet.
 - b. Tutup kapas dimasukkan ke dalam mulut pipet untuk mengurangi kontaminasi.
 - c. Tidak diperkenankan meniupkan udara atau mencampur bahan infeksi dengan cara menghisap dan meniup cairan lewat pipet.
 - d. Tidak diperkenankan mengeluarkan cairan dari dalam pipet secara paksa.
 - e. Gunakan pipet ukur karena cairan tidak perlu dikeluarkan sampai tetes terakhir
 - f. Digunakan kapas yang telah diberi desinfektan bila ada tetesan cairan yang jatuh di meja kerja dan kapas dibuang di tempat penampungan pembuangan khusus untuk diotoklaf.
 - g. Pipet habis pakai direndam dalam wadah berisi desinfektan, dibiarkan selama 18-24 jam sebelum disterilkan.

2. Cara pembukaan wadah

Pembukaan wadah (botol, cawan petri, semprit, tabung biakan, dan lain-lain) dari bahan yang berpotensi menginfeksi dengan risiko tak terlihat yang menimbulkan aerosol atau kontaminasi pada kulit atau daerah kerja harus dilakukan dengan hati-hati.

Berbagai pencegahan yang dapat dilakukan untuk menghindari risiko terinfeksi adalah sebagai berikut :

- a. Alat Pelindung Diri (APD) digunakan dengan benar.
- b. Tutup wadah dibuka dengan hati-hati agar tidak terjadi aerosol.
- c. Spesimen yang bocor atau pecah hanya boleh dibuka di dalam *Bio safety cabinet*.

3. Cara pemeliharaan/pemakaian lemari pendingin dan lemari pembeku
 - a. Lemari pendingin, lemari pembeku (*freezer*) dan tabung es kering (*dry ice*) harus dibersihkan dan esnya dicairkan (*defrost*) secara teratur.
 - b. Setelah dibersihkan, permukaan dalam lemari pendingin dan lemari pembeku harus didesinfeksi dengan desinfektan yang tidak korosif.
 - c. Semua wadah yang disimpan harus diberi label yang jelas berisi nama bahan, tanggal disimpan dan nama orang yang menyimpan.
 - d. Wadah yang tidak berlabel dan bahan yang sudah kadaluwarsa harus dimusnahkan.
 - e. Cairan yang mudah terbakar tidak boleh disimpan dalam lemari pendingin.

C. PENGOLAHAN SPESIMEN

1. Penerimaan spesimen di laboratorium
 - a. Laboratorium mempunyai loket khusus penerimaan spesimen. Jika jumlah spesimen tidak banyak, maka tempat pemeriksaan spesimen dapat dilakukan pada meja khusus dalam area laboratorium.
 - b. Spesimen harus ditempatkan dalam wadah yang tertutup rapat untuk mencegah tumpahnya/bocornya spesimen.
 - c. Wadah harus dapat didesinfeksi atau diotoklaf.
 - d. Wadah terbuat dari bahan tidak mudah pecah/bocor.
 - e. Wadah diberi label tentang identitas spesimen.
 - f. Wadah diletakkan pada baki khusus yang terbuat dari logam atau plastik yang dapat didesinfeksi atau diotoklaf ulang.
2. Petugas penerima spesimen
 - a. Semua petugas penerima spesimen harus mengenakan jas laboratorium.
 - b. Semua spesimen dianggap infeksius dan ditangani dengan hati-hati.
 - c. Meja penerima spesimen harus dibersihkan dengan desinfektan setiap hari.

- d. Tidak diperkenankan menggunakan ludah untuk merekatkan label.
 - e. Tidak diperkenankan makan/minum dan merokok saat bekerja.
 - f. Cuci tangan dengan sabun/desinfektan setiap selesai bekerja dengan spesimen.
 - g. Tamu/pasien tidak diperbolehkan menyentuh apapun pada meja dimana spesimen tersimpan.
3. Petugas pembawa spesimen dalam laboratorium
- a. Mengenakan Alat Pelindung Diri (APD) saat membawa spesimen.
 - b. Membawa spesimen dalam *specimen container*.
 - c. Mencuci tangan dengan desinfektan jika terkena tumpahan/percikan dari spesimen. Jika spesimen bocor/tumpah, dekontaminasi *specimen container* dan sisa spesimen diotoklaf.
 - d. Laporkan pada petugas/tim keamanan kerja laboratorium jika terluka saat bekerja.
4. Pencegahan terhadap paparan infeksi pada saat bekerja di laboratorium
- Semua petugas laboratorium harus bekerja sesuai Standar Prosedur Operasional (SPO) keselamatan dan keamanan kerja di laboratorium dan menganggap semua spesimen merupakan bahan infeksius.
- Hal-hal yang penting dalam keselamatan dan keamanan kerja di laboratorium:
- a. Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD).
 - b. Pengambilan spesimen hanya boleh dilakukan oleh petugas laboratorium.
 - c. Pemeriksaan sesuai Standar Prosedur Operasional (SPO)
 - d. Pengelolaan limbah

D. KECELAKAAN DI LABORATORIUM

Di laboratorium, infeksi bakteri merupakan risiko yang sering terjadi sebagai penyebab penularan utama pada petugas laboratorium, oleh sebab itu perlu diupayakan tindakan pencegahan dengan menyediakan fasilitas K3 laboratorium, antara lain:

1. Perlindungan terhadap petugas laboratorium

- a. Pemeriksaan kesehatan petugas secara rutin
 - b. Pemberian imunisasi/vaksinasi pada petugas secara berkala
 - c. Peningkatan daya tahan tubuh petugas
 - d. Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) secara benar
2. Peralatan K3 :
- a. Desinfektan
 - b. Peralatan P3K
 - c. *Shower* dan *eye shower*
 - d. *Spill kit*
 - e. Alat deteksi kebakaran
 - f. Alat Pemadam Api Ringan (APAR)
 - g. Petunjuk arah evakuasi

E. PENGELOLAAN KEAMANAN LABORATORIUM

Keamanan laboratorium (*biosecurity*) sebaiknya ditunjukkan secara khusus terhadap kebijakan dan prosedur yang berkaitan dengan keamanan fisik, keamanan staf, keamanan transportasi, pengawasan bahan, dan keamanan informasi. Sebaiknya juga termasuk protokol tanggap darurat yang berhubungan dengan masalah keamanan, yang melibatkan pemadam kebakaran, petugas medis darurat serta petugas keamanan/polisi. Pelatihan diperlukan dalam rangka persiapan menghadapi keadaan darurat, sehingga pelatihan yang terus menerus untuk seluruh petugas laboratorium yang berkaitan dengan keamanan akan menjamin penerapan yang lebih baik. Selain uraian sebagaimana tersebut di atas, terkait dengan pengelolaan keamanan laboratorium dilaksanakan sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.

BAB V
PEMANTAPAN MUTU

Pemantapan mutu laboratorium adalah suatu sistem yang dirancang untuk meningkatkan dan menjamin mutu serta efisiensi pemeriksaan laboratorium secara berkesinambungan sehingga hasilnya dapat dipercaya. Kegiatan pemantapan mutu laboratorium terdiri atas:

1. Pemantapan Mutu Internal (PMI) atau *Internal Quality Control*
 2. Pemantapan Mutu External (PME) atau *External Quality Assurance* (EQA)
 3. Peningkatan mutu (*Quality Improvement*)
- A. PEMANTAPAN MUTU INTERNAL (PMI) ATAU *INTERNAL QUALITY CONTROL*

Pemantapan mutu internal biasa disebut *quality control* merupakan program yang dilakukan setiap laboratorium untuk melakukan pengujian mutu ujinya sendiri secara berkesinambungan dan menyeluruh, mencakup semua tahap kegiatan laboratorium, mulai dari pra analitik, analitik sampai pasca analitik.

Pemantapan mutu internal untuk pemeriksaan *Corynebacterium diphtheriae* dilakukan terhadap seluruh kegiatan dalam melakukan pemeriksaan laboratorium *C. diphtheriae*. Semua pedoman prosedur pemeriksaan laboratorium *Corynebacterium diphtheriae* yang telah dibuat dan dijalankan menjadi rujukan penilaian pemantapan mutu internal laboratorium. Adapun hal yang menjadi perhatian dalam melakukan pemantapan mutu internal *Corynebacterium diphtheriae* adalah adanya:

1. Buku pedoman pemeriksaan laboratorium difteri
2. Standar Prosedur Operasional (SPO) perawatan peralatan laboratorium
3. *Quality control* bakteri yang digunakan untuk uji biakan, isolasi dan identifikasi

Uji Kualitas Media dan Reagensia pada Pemeriksaan Biakan Difteri

Jenis Media / Reagen	Mikroorganisme	Hasil yang diharapkan	Frekuensi pengujian kualitas media dan reagensia
Amies	Streptococcus	Tumbuh pada	Setiap batch

Jenis Media / Reagen	Mikroorganisme	Hasil yang diharapkan	Frekuensi pengujian kualitas media dan reagensia
transport medium	<i>pyogenes</i> ATCC 19615	saat penanaman sub biakan	baru dan lot number baru
	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069		
Media Hoyles	<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i> NCTC 10648	Hitam, mengkilat pada permukaanya (Baik)	Setiap kali pembuatan media
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Terhambat/ tidak tumbuh	
Media Agar Darah Telurite	<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i> NCTC 10648	Hitam, mengkilat pada permukaanya (Baik)	Setiap kali pembuatan media
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Terhambat/ tidak tumbuh	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Terhambat/ tidak tumbuh	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Hitam, koloninya kecil sekali (Kurang baik)	
Media Agar Darah Columbia	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Tumbuh koloni <i>stretococcus</i> β haemolyticus	Setiap kali pembuatan media
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Tumbuh koloni <i>stretococcus</i> α haemolyticus	
Media Tinsdale	<i>C. diphtheriae</i> var. <i>belfanti</i> NCTC 10356	Tumbuh koloni warna hitam yang dikelilingi	Setiap kali pembuatan media dan setiap

Jenis Media / Reagen	Mikroorganisme	Hasil yang diharapkan	Frekuensi pengujian kualitas media dan reagensia
		zona bayangan hitam (kontrol positif)	kali pengujian Cystinase test
	Corynebacterium ulcerans NCTC 764	Tumbuh koloni warna hitam tanpa dikelilingi zona bayangan hitam (Kontrol negatif)	
Media Starch	C. diphtheriae var. gravis NCTC 10648	Terjadi perubahan warna menjadi Kuning (Kontrol positif)	Setiap kali pembuatan media dan setiap kali pengujian Hiss serum water sugar
	C. diphtheriae var. belfanti NCTC 10356	Tidak terjadi perubahan warna (Kontrol negatif)	
Media Urea	Corynebacterium ulcerans NCTC 764	Tidak terjadi perubahan warna (Kontrol negatif)	Setiap kali pembuatan media dan setiap kali uji skrining Corynebacterium patogen
	Corynebacterium striatum NCTC 12077	Terjadi perubahan warna menjadi pink (Kontrol positif)	
Pyrazinamidase Solution	Corynebacterium ulcerans NCTC 764	Terjadi perubahan warna menjadi orange-merah	Setiap kali pembuatan reagen dan setiap kali uji

Jenis Media / Reagen	Mikroorganisme	Hasil yang diharapkan	Frekuensi pengujian kualitas media dan reagensia
		(Kontrol positif)	skrining
	Corynebacterium striatum NCTC 12077	Tidak terjadi perubahan warna (Kontrol negatif)	Corynebacterium patogen
Nitrat Broth	Corynebacterium ulcerans NCTC 764	Terjadi perubahan warna menjadi merah (Kontrol positif)	Setiap kali pembuatan reagen dan setiap kali uji skrining
	Corynebacterium striatum NCTC 12077	Tidak terjadi perubahan warna (Kontrol negatif)	Corynebacterium patogen
Reagen Pewarnaan Gram	S. aureus ATCC 25923	Tampak bakteri Gram positif coccus	Setiap minggu dan setiap penggunaan
	E. coli ATCC 25922	Tampak bakteri Gram negatif batang	batch dan lot number baru

B. PEMANTAPAN MUTU EKSTERNAL (PME) ATAU *EXTERNAL QUALITY ASSURANCE* (EQA)

Pemantapan Mutu Eksternal disebut juga *quality assessment* dimana kinerja laboratorium dinilai oleh suatu instansi lain yang lebih kompeten. Hal ini dilakukan secara periodik.

Pemantapan mutu eksternal laboratorium difteri diselenggarakan oleh laboratorium rujukan nasional melalui kegiatan asistensi teknis dan/atau bimbingan teknis dan panel tes. Pemeriksaan mutu eksternal untuk laboratorium rujukan nasional dilakukan melalui kerjasama dengan *World Health Organization Collaborating Centre (WHO-CC) for Diphtheriae and Streptococcal Infection*.

C. PENINGKATAN MUTU

Peningkatan mutu adalah proses yang terus menerus dilakukan oleh laboratorium dengan cara menganalisis setiap aspek dalam pemeriksaan laboratorium dan sebagai tindak lanjut kegiatan PMI dan PME untuk meningkatkan kinerja laboratorium.

Komponen kunci dalam proses ini meliputi identifikasi masalah, yang dilanjutkan dengan menyusun rencana tindak lanjut untuk perbaikan, menetapkan prosedur baru, dan menjadwalkan evaluasi berkala dalam pemantauan yang dilakukan secara terus menerus.

BAB VI
PENUTUP

Pemeriksaan yang dilakukan sesuai dengan standar pada spesimen yang berkualitas dapat memberikan hasil yang akurat dan terpercaya, dengan tersusunnya Pedoman Pemeriksaan Difteri di Laboratorium ini, semoga dapat menjadi acuan bagi tenaga kesehatan yang memiliki kompetensi dan kewenangan/tenaga lainnya dalam melakukan pemeriksaan difteri guna menunjang penegakan diagnosis penyakit difteri dan surveilans, mulai pengambilan spesimen sampai pembacaan hasil serta pencatatan dan pelaporannya.

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA,

NILA FARID MOELOEK