

Permasalahan dan Pemeriksaan *Actinobacillus*

Problems and Examination of Actinobacillus

Ika Ningsih^{1)*} & Edy Wiranto²⁾

1)Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia

2)Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia

*Corresponding author: ikaningsih@yahoo.com

ABSTRAK

Actinobacillus termasuk bakteri oportunistik dan merupakan flora komensal dalam tubuh inang. Pada kondisi normal tidak menyebabkan penyakit dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini terutama dipicu oleh invasi bakteri komensal inang atau bakteri dari lingkungan masuk ke jaringan tubuh inang. Sebagian besar spesies *Actinobacillus* ditemukan secara khas sebagai komensal pada saluran pernapasan, pencernaan dan genital dari beberapa spesies hewan maupun manusia. Bakteri ini bersifat bakteri Gram negatif yang berbentuk basil, tidak bergerak, tidak membentuk endospora, bersifat anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik serta mampu memfermentasikan karbohidrat, mereduksi citrat, urease positif. Sebagian besar spesies *Actinobacillus* tumbuh lambat pada media perbenihan agar darah dan agar coklat. Oleh karena prevalensi dan virulensinya tidak setinggi bakteri oportunistik lainnya mengakibatkan jarang ditemukan kasus infeksi *Actinobacillus* dan kasusnya pada manusia tidak banyak dilaporkan. Oleh karena itu pemeriksaan laboratorium untuk menunjang diagnosis pasti infeksi oleh *Actinobacillus* sangat diperlukan. Pemeriksaan mikrobiologi antara lain dilakukan dengan uji mikroskopik, biakan, identifikasi biokimia, kepekaan terhadap antibiotik, uji molekuler seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*), *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) dan hibridisasi DNA.

Kata kunci: *Actinobacillus*, Permasalahan, Pemeriksaan mikrobiologi

ABSTRACT

Actinobacillus is an opportunistic bacteria and commensal flora in the body host. Under normal conditions it does not cause disease and infection occurs by the invasion of the host's commensal bacteria or from the environment into the host's body. Most species of *Actinobacillus* are found typically as commensals in the respiratory, gastrointestinal and genital tracts of several animal and human species. Gram-negative bacteria, rod shaped, non motile, does not have endospores, facultative anaerobic or microaerophilic, carbohydrates fermenting and citrate reductor, positive urease. Most species of *Actinobacillus* grow on blood agar and chocolate agar. Because the prevalence and virulence are not as high as other opportunistic bacteria, *Actinobacillus* infection is rarely found and cases in humans are not widely reported. Therefore, laboratory tests to support a definite diagnosis of infection by *Actinobacillus* are necessary. Microbiological examinations is done by microscopic, culture, biochemical identification, antibiotic susceptibility test and molecular tests such as *Polymerase Chain Reaction*, *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) and DNA hybridization.

Keywords: *Actinobacillus*, Problems, Microbiological examination.

PENDAHULUAN

Bakteri adalah salah satu kelompok mikroba yang paling banyak ditemukan di hampir semua jenis habitat (tempat tinggal mikroba) dan jumlahnya paling banyak dibandingkan makhluk hidup lain dan tersebar luas didunia. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat, laut, udara dan tempat-tempat ekstrem. Keberadaannya pada suatu habitat dapat menimbulkan baik efek positif seperti dekomposer (pengurai) ataupun efek negatif seperti proses pembusukan makanan. Habitatnya bervariasi mulai dari lingkungan hingga pada tubuh makhluk hidup seperti manusia. Tubuh manusia memberikan habitat dan niche (peran mikroba dalam suatu ekosistem) yang bervariasi untuk kelompok mikroba seperti bakteri, dimana terdapat variasi faktor lingkungan seperti suhu, pH, nutrisi, kelembapan dan kebutuhan akan oksigen. Oleh karena itu tubuh makhluk hidup terdiri dari banyak mikroba.(Talaro *et al.*, 2019., Rini *et al.*, 2020)

Keberadaan bakteri pada tubuh manusia menyebabkan adanya interaksi antar keduanya. Interaksi ini dapat bersifat positif ataupun negatif seperti bakteri dapat memberikan perlindungan dan efek stabilisasi pada permukaan tubuh manusia dengan mengkolonisasi bagian tersebut sebagai bakteri residen (tetap). Bakteri dapat berperan dalam proses maturasi pertahanan inang dan perkembangan sistem imun serta dapat menginvasi dan tumbuh pada jaringan steril dimana dalam proses ini bakteri menyebabkan kerusakan jaringan dan organ. Dalam kasus tertentu mikroba berhasil mengkolonisasi namun tidak menyebabkan penyakit dikenal sebagai carrier (orang tanpa gejala) (Carroll *et al.*, 2016; Talaro *et al.*, 2019)

Kelompok bakteri yang menyebabkan infeksi dibagi menjadi 2, yaitu bakteri patogen primer / utama yang selalu dapat menyebabkan penyakit apabila terjadi proses kolonisasi pada

jaringan manusia dan bakteri patogen oportunistik yang hanya menyebabkan infeksi oportunistik. Infeksi oportunistik adalah infeksi yang terjadi akibat mikroba seperti bakteri yang tidak menyebabkan penyakit namun berubah menjadi patogenik apabila sistem pertahanan tubuh terganggu. Pertahanan ini dapat berupa penurunan fungsi sistem imun/kekebalan tubuh, perubahan pada susunan mikrobiota (kumpulan mikroba yang hidup pada tubuh inang (host), dan penyakit lainnya yang turut mengganggu fungsi sistem imun. Umumnya bakteri oportunistik adalah bakteri komensal, dimana bakteri ini umumnya terdapat pada orang yang sehat dan tidak menimbulkan penyakit. Banyak faktor yang berperan dalam proses transisi ini seperti jenis patogen, faktor virulensi yang dihasilkan, tingkat supresi imun, genetik dari inang dimana semuanya dapat berperan dalam proses manifestasi klinis dari infeksi bakteri oportunistik. Salah satu bakteri tersebut adalah genus *Actinobacillus* (Levinson, 2008; Martinez, 2014; Riccardi *et al.*, 2019).

GENUS *Actinobacillus*

Bakteri dari genus *Actinobacillus* adalah salah satu kelompok bakteri yang ditemukan banyak pada berbagai habitat. Secara taksonomi, bakteri ini termasuk ke dalam famili Pasteurellaceae dimana sebagian besar spesies dari famili ini bersifat komensal atau parasit pada vertebrata dan tidak dapat bertahan hidup pada jangka waktu yang lama diluar inangnya. Genus lainnya dari famili Pasteurellaceae ini yang terkenal adalah genus *Pasteurella* dan *Haemophilus* yang merupakan bakteri patogen utama pada manusia (Garrity *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2013).

Genus *Actinobacillus* yang terdapat dalam Pasteurellaceae tergolong dalam Gammaproteobacteria dan berkerabat dengan Enterobacteriaceae, Vibrionaceae serta Aeromonadaceae. Taksa lainnya yang berkerabat dekat pada Gammaproteobacteria adalah kompleks *Pseudomonas fluorescens*,

Moraxellaceae, dan Cardiobacteriaceae. *Actinobacillus* dibedakan dengan Enterobacteria melalui ukuran genomnya yang lebih kecil seperti *A. pleuropneumoniae* yang hanya berukuran 2404 ± 40 kb, tidak memiliki flagel dan umumnya bersifat oksidase positif (Garrity *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2013).

Dari segi morfologi, bakteri ini berbentuk basil/batang dan kadang juga dijumpai bentuk lainnya seperti kokobasil (batang pendek seperti kokus). Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif, tidak tahan asam, tidak membentuk endospora, namun memiliki lapisan *slime* tipis pada permukaan sel. Sifat lainnya adalah tidak memiliki flagel/alat gerak (non-motil), tidak berpigmen, memiliki kebutuhan oksigen yang bervariasi yaitu aerob (membutuhkan oksigen untuk hidupnya), mikroaerofilik (memerlukan 5-10% CO₂ atau dapat hidup dibawah kadar oksigen minimum) dan fakultatif anaerob (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen) (Garrity *et al.*, 2010; Procop *et al.*, 2017; Chapa *et al.*, 2021).

PERMASALAHAN

Genus *Actinobacillus* diketahui merupakan mikrobiota normal pada bagian oral berbagai makhluk hidup. Umumnya genus *Actinobacillus* memiliki virulensi (derajat kemampuan mikroba mengakibatkan penyakit) yang rendah serta biasanya menyebabkan infeksi pada manusia setelah bakteri menginvasi bagian steril pada manusia melalui beberapa cara seperti gigitan, penyebaran droplet (cairan atau cipratan liur yang dikeluarkan dari hidung atau mulut saat bersin, batuk dan berbicara) dari manusia ke manusia atau manipulasi rongga oral. Jenis infeksinya juga bervariasi, mulai dari periodontitis (penyakit gusi) hingga endocarditis (infeksi pada lapisan dalam jantung/endokardium). Sebagian besar spesies *Actinobacillus* ditemukan secara khas sebagai komensal pada mukosa pencernaan, pernafasan dan genital dari beberapa spesies hewan dan manusia tetapi beberapa hanya terjadi sebagai patogen sedangkan spesies komensal ditemukan dalam berbagai lesi (kerusakan atau ketidaknormalan setiap bagian atau jaringan di

dalam tubuh). Hanya beberapa spesies *Actinobacillus* yang ditemukan menyebabkan infeksi pada manusia seperti *A. pleuropneumoniae*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. hominis*, *A. ureae* (Rosenberg *et al.*, 2013., Procop *et al.*, 2017., Tille, 2017).

Pada manusia, hanya *A. actinomycetemcomitans* yang merupakan flora normal pada rongga mulut bersama dengan bakteri lainnya seperti *Porphyromonas gingivalis*. Keduanya berperan dalam proses pembentukan biofilm (suatu kumpulan mikroba yang melekat pada permukaan padat, permukaan tersebut berupa jaringan hidup maupun jaringan mati) dalam bentuk plak gigi dan dalam kasus ekstrim dapat menyebabkan *Localized Aggressive Periodontitis* (LAP) dimana terjadi aktivasi osteoklas (sel pemecah tulang) sehingga terjadi resorpsi tulang yaitu periodontitis. *A. hominis* dan *A. ureae* ditemukan pada saluran pernafasan manusia yang sehat dan juga ditemukan dalam beberapa kasus infeksi manusia dan berperan dalam patogenesis sinusitis (peradangan pada jaringan selaput sinus yang terletak di sekitar tulang wajah), bronkopneumonia (peradangan pada pipa saluran pernafasan (bronkus) dan kantung kecil di paru-paru (alveoli) dan meningitis (peradangan pada meningen, yaitu lapisan pelindung otak dan saraf tulang belakang). Keduanya berhasil diisolasi dari pasien dengan meningitis setelah trauma atau pembedahan. Untuk spesies lainnya host dari bakteri *Actinobacillus* juga bervariasi dengan masing-masing host umumnya dihuni oleh 1 spesies serta ditemukan dapat menyebabkan penyakit spesifik seperti *sleepy foal disease* (penyakit anak kuda yang mengantuk, merupakan bentuk septikemia (infeksi aliran darah serius/ keracunan darah) fatal pada anak kuda baru lahir yang terinfeksi dalam rahim atau setelah lahir melalui umbilikus (pusar) yang dapat berkembang menjadi bentuk kronis, penyakit sendi, menghasilkan lesi (kerusakan atau ketidaknormalan setiap bagian atau jaringan di dalam tubuh) pada ginjal, sendi, dan paru-paru kemudian dapat menyebabkan kematian dalam 48 jam akibat *A. equuli* pada kuda. Penyakit

lainnya seperti *wooden tongue* (actinobacillosis/penyakit lidah kaku seperti papan) yang disebabkan oleh *A. lignieresii* pada ruminansia (hewan pemamah biak). Hanya *A. pleuropneumoniae* bersifat patogen primer

dimana infeksi oleh bakteri ini menyebabkan pneumonia (radang paru paru) serius pada hewan babi dan kasusnya pada manusia tidak banyak dilaporkan (Tille, 2017; de la Maza *et al.*, 2020).

Tabel 1. Daftar spesies *Actinobacillus* yang telah ditemukan pada berbagai host/inang (Rosenberg *et al.*, 2013)

Takson	Genus atau genus seperti takson	Potensi Patogen	Penyakit utama	Host/Inang
<i>Actinobacillus capsulatus</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	Artritis, Septikemia	Kelinci
<i>Actinobacillus equuli subsp. equuli</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	Septikemia “Sleepy foal disease”	Kuda, Babi
<i>Actinobacillus equuli subsp. haemolyticus</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	NI	Kuda
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	Actinobacillosis, lesi pyogranulomatosa, “wooden tongue”	Ruminansia (hewan pemamah biak)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus</i>	Patogen primer	Nekrotikan fibrinosa Pneumoniae	Babi
<i>Actinobacillus seminis</i>	<i>Aerogenes</i>	Oportunistik	Infeksi saluran urogenital, Epididimitis	Domba
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	<i>Succinogenes</i>	Komensal	NI	Roden (Hewan pengerat)
<i>Actinobacillus suis</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	Pneumoniae, Septikemia	Babi
<i>Actinobacillus hominis</i> , <i>Actinobacillus urease</i>	<i>Actinobacillus</i>	Oportunistik	NI	Manusia
<i>Actinobacillus minor</i>	<i>Minor</i>	Komensal	NI	Babi
<i>Actinobacillus muris</i>	<i>Muribacter</i>	Komensal	NI	Roden (Hewan pengerat)
<i>Actinobacillus rossii</i>	<i>Rossii</i>	Oportunistik	Infeksi saluran reproduksi	Babi
<i>Actinobacillus porciton sillarum</i>	<i>Minor</i>	Komensal	NI	Babi
<i>Actinobacillus (aggregatibacter actinomycetemcomitans)</i>	<i>aggregatibacter</i>	Oportunistik	Peridontitis Juvenile (agresif lokal)	Primata

Dari jumlah kasus, tidak banyak kasus infeksi *Actinobacillus* ditemukan mengingat prevalensi (jumlah kasus suatu penyakit dalam suatu populasi pada suatu waktu, sebagai proporsi dari jumlah total orang dalam populasi tersebut) dan virulensinya (kemampuan mikroba patogenik untuk menyebabkan kerusakan pada inang atau menimbulkan penyakit) tidak setinggi bakteri oportunistik lainnya seperti *Pseudomonas* yang dapat bertahan lama pada lingkungan. *Actinobacillus* hanya dapat bertahan selama 8 jam pada suhu 5-25°C diluar inangnya dimana durasi ini diperpanjang apabila suhu menurun (> 1 tahun pada -20°C) dan diperpendek apabila suhu meningkat (< 8 jam pada suhu 37°C atau < 4 jam pada suhu 42°C) (Assavacheep *et al.*, 2012).

Paparan secara langsung pada hewan yang terinfeksi menjadi satu-satunya sumber infeksi dan dalam kasus oportunistik, mikrobiota pada makhluk hidup dapat berubah menjadi patogen (agen biologis yang menyebabkan penyakit pada inangnya) akibat menginvasi bagian-bagian steril yang tidak seharusnya ditumbuhi oleh patogen (Tille, 2017). Selain itu, paparan juga dapat terjadi melalui lingkungan, mengingat genus *Actinobacillus* memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm (suatu kumpulan mikroba yang melekat pada permukaan padat, permukaan tersebut berupa jaringan hidup maupun jaringan mati) tidak hanya pada oral, tapi juga pada permukaan abiotik yaitu permukaan plastik (Tremblay *et al.*, 2013). Prevalensi ini juga ditemukan meningkat pada

pasien dengan penurunan sistem kekebalan tubuh (*immunocompromised*) atau pasien dengan infeksi virus (de la Maza *et al.*, 2020).

Satu-satunya spesies yang paling banyak ditemukan menginfeksi manusia adalah *A. actinomycetemcomitans* yang menyebabkan antara lain penyakit periodontitis (penyakit gusi) pada orang dewasa, endokarditis (infeksi pada lapisan bagian dalam jantung atau katup jantung), abses (penumpukan nanah pada satu daerah tubuh/bisul), osteomielitis (infeksi pada tulang) (Procop *et al.*, 2017). *A. actinomycetemcomitans* merupakan salah satu bakteri yang mempunyai viruensi yang tinggi karena dapat mengeluarkan toksin yang mempunyai kemampuan menghambat komponen-komponen pada sistem imun seperti PMN (Granulosit atau leukosit Polimorfonuklear adalah sel darah putih yang memiliki butiran-butiran kecil dalam sitoplasma selnya atau yang disebut dengan granula. Granulosit dibagi lagi menjadi beberapa jenis yaitu neutrofil, basofil, eosinofil, dan sel mast), imunoglobulin (antibodi yaitu protein yang diproduksi oleh sel dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan alergen, bakteri, serta virus penyebab penyakit), aktivitas komplemen dan juga penyebab periodontitis yang merupakan penyakit umum ditemukan terutama di Indonesia dan menempati urutan kedua setelah karies gigi (Carranza *et al.*, 2006; Gillepsie *et al.*, 2006; Joshipura *et al.*, 2015). *A. actinomycetemcomitans* hampir selalu ditemukan pada kasus periodontitis dan tingkat prevalensinya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ras/etnis, umur, dan keparahan periodontitis. Pada pasien dengan periodontal yang sehat, *A. actinomycetemcomitans* hanya dideteksi pada 0.90% kasus, sedangkan pada kasus periodontitis, prevalensinya meningkat hingga mencapai 33.62%. Prevalensi ini semakin menurun seiring dengan bertambahnya umur yaitu 20-35 tahun (44.12%), 36-55 tahun (36.36%), dan 56-75 tahun (22.73%). Tingkat keparahan periodontitis juga mempengaruhi prevalensi *A. actinomycetemcomitans*, dimana pada kasus infeksi *A. actinomycetemcomitans*,

prevalensi bakteri ini adalah sebesar 21% dan prevalensinya menjadi 90% apabila kasus periodontitis berkembang menjadi periodontitis agresif. Studi populasi juga menunjukkan adanya perbedaan komposisi mikrobiota oral, dan dengan demikian prevalensi *A. actinomycetemcomitans* juga berbeda antar satu ras/etnis dengan yang lainnya. Studi pada pasien periodontitis di Spanyol dan Netherland menunjukkan prevalensi sebesar 23% dari seluruh pasien, sedangkan pada pasien periodontitis di Belanda, angka prevalensi hanya ditemukan sebesar 3%. Studi pada pasien periodontitis di USA juga menunjukkan hal yang sama, dimana terdapat perbedaan prevalensi *A. actinomycetemcomitans* antara ras Afrika-Amerika dan Asia-Amerika yaitu sebesar 1,5 x bila dibandingkan dengan ras Kaukasia (Gillepsie *et al.*, 2006; Procop *et al.*, 2017).

Di Asia sendiri, angka ini bervariasi antar-negara atau daerah seperti pada Cina yaitu 62% dimana angka tertinggi ditemukan pada studi yang dilakukan pada pasien di Vietnam (78%). Studi yang dilakukan di Pulau Jawa menunjukan dari 128 pasien berumur 15-25 tahun, prevalensi *A. actinomycetemcomitans* adalah sebesar 36%. Perbedaan prevalensi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti tingkat kebersihan oral masyarakat dan tingkat sosio-ekonomi dari masyarakat, negara atau daerah tersebut (Rylev *et al.*, 2008; Amalina, 2009).

Selain itu, jenis kelamin turut mempengaruhi prevalensi *A. actinomycetemcomitans*, dimana hal ini berkaitan dengan hormon yang disekresikan seperti estrogen dan progesteron. Pelepasan ini meningkat drastis saat perempuan mencapai fase pertumbuhan tertentu seperti pubertas, ovulasi, dan kehamilan. Keduanya berperan dalam proliferasi fibroblas dan pematangan kolagen. Progesteron juga menyebabkan pengurangan perbaikan dan pemeliharaan gingiva (gusi) akibatnya struktur gingiva dapat terganggu yang menyebabkan meningkatnya kemungkinan pembesaran gingiva, pendarahan dan perubahan komponen mikroba di sekitar gingiva yang mendukung perkembangan penyakit

periodontitis (penyakit gusi) (Amalina, 2009; Markou *et al*, 2009).

PEMERIKSAAN LABORATORIUM

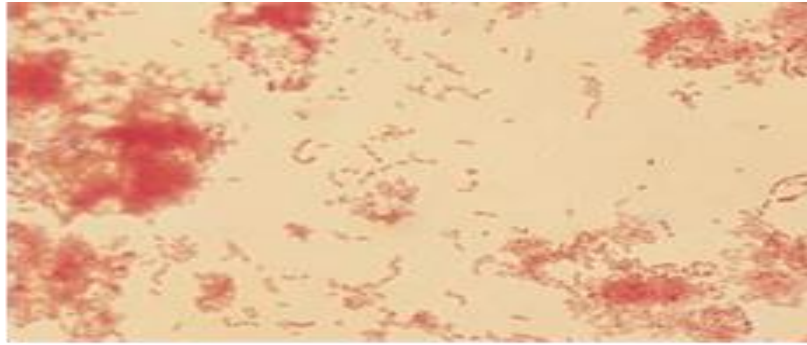
1. Pemeriksaan Mikroskopik

Mikroba mempunyai morfologi/bentuk, struktur dan sifat-sifat yang khas, begitu pula dengan bakteri. Visualisasi bakteri dalam keadaan hidup sulit dilakukan, hal ini bukan hanya karena ukurannya yang sangat kecil tetapi karena bakteri bersifat transparan dan tidak berwarna bila disuspensikan dalam media cair. Salah satu cara untuk mengamati bentuk sel bakteri sehingga mudah untuk diidentifikasi adalah dengan metode pewarnaan. Untuk semua prosedur pewarnaan bakteri dibutuhkan pembuatan apusan lebih dahulu sebelum dilakukan beberapa teknik pewarnaan yang spesifik. Terdapat beberapa teknik pewarnaan bakteri seperti pewarnaan Gram, *acid-fast* (tahan asam), flagela, kapsul, spora, granul, namun yang paling sering digunakan untuk mewarnai sel bakteri adalah pewarnaan Gram yaitu teknik pewarnaan diferensial yang paling penting pada bakteriologi. Berdasarkan komponen penyusun dinding selnya, bakteri dapat dikelompokkan menjadi bakteri Gram positif (berwarna ungu) yang memiliki satu lapisan tunggal peptidoglikan dan bakteri Gram negatif (berwarna merah) yang memiliki tiga lapisan yaitu membran luar, dinding sel dan membran plasma. Peptidoglikan merupakan komponen utama dari bakteri Gram positif, sedangkan lipid merupakan komponen terbesar penyusun bakteri Gram negatif. Pemeriksaan Gram diindikasikan untuk memperoleh karakteristik dan klasifikasi bakteri yang berasal dari spesimen yang akan digunakan untuk pengambilan keputusan klinis lebih lanjut. Tujuan dari pewarnaan Gram adalah untuk mempermudah melihat bakteri secara mikroskopik, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, melihat struktur dalam bakteri seperti dinding sel dan vakuola serta menghasilkan sifat-sifat fisik serta kimia khas dari bakteri dengan zat warna serta dapat melihat bentuk bakteri seperti basil/batang, kokus/bulat

atau spiral (Carroll *et al.*, 2016; Tille, 2017; Goering *et al.*, 2019; Bulele *et al.*, 2019).

Pewarnaan Gram menggunakan beberapa bahan yaitu Gentian violet/ungu (zat warna utama/ *primary stain*), Lugol (pengintensifan pewarna utama), Alkohol 95% (peluntur pewarna bakteri) dan Safranin (pewarna penutup/*counter stain*). Bakteri Gram-negatif akan bewarna merah karena kehilangan zat pewarna Gentian violet/ungu setelah dilunturkan dengan alkohol dan sewaktu diberi zat pewarna tandingannya yaitu dengan zat safranin akan tampak berwarna merah (Cappucino *et al.*, 2005; Bauman, 2011). Kelebihan dari pewarnaan Gram adalah merupakan salah satu metode paling sederhana, murah dan cepat untuk diagnosis infeksi bakteri. Metode ini jauh lebih cepat dibandingkan dengan kultur bakteri dan sebagai pedoman awal untuk memutuskan terapi antibiotik sebelum tersedia bukti definitif bakteri penyebab infeksi secara spesifik. Sedangkan Kekurangan dari metode ini adalah hanya dapat mengetahui ukuran dan bentuk bakteri serta melihat struktur dalam bakteri hanya dengan zat warna (Bulele *et al.*, 2019).

Sel *Actinobacillus* diwarnai dengan prosedur pewarnaan Gram terlebih dahulu sebelum diamati dibawah mikroskop. *Actinobacillus* merupakan bakteri Gram negatif dan ketika diamati dibawah mikroskop menunjukkan sifat pleomorfisme yaitu dimana bentuk basil/batang dapat ditemukan bersamaan dengan bentuk kokus/bulat-basil/batang, filamen, granul atau bahkan kombinasi basil dengan bentuk kokus pada masing-masing ujungnya sehingga membentuk struktur seperti kode morse. *Actinobacillus* apabila diamati menggunakan pewarnaan kapsul/simpai (cara Gins-Burri) dengan menggunakan tinta india, lapisan *slime* ekstrasel dan kapsul dapat diamati dibawah mikroskop. Ukuran sel nya berkisar antara $0.4 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ dan sel ditemukan dalam bentuk tunggal atau berantai (Garritty *et al.*, 2010).



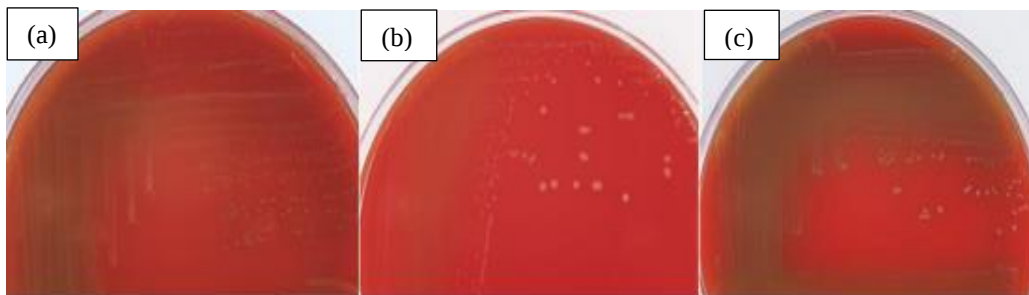
Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram pada bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (de la maza *et al.*, 2020)

2. Biakan atau Kultur

Biakan bakteri pada media perbenihan menjadi salah satu prosedur penting untuk tujuan identifikasi *Actinobacillus* dari bakteri lainnya. Bakteri *Actinobacillus* dan bakteri dari famili Pasteurellaceae umumnya ditumbuhkan pada suhu 35°C dan dalam suasana anaerob fakultatif atau mikroaerofilik (5-10% CO₂). Media pertumbuhan yang digunakan adalah agar darah (5% darah domba) dan agar coklat selanjutnya media diinkubasi pada inkubator CO₂ (alat yang digunakan untuk proses inkubasi dan perkembangbiakan bakteri serta mampu menyediakan keadaan penuh karbondioksida) atau menggunakan *candle jar* (toples dengan nyala lilin untuk mengurangi ketersediaan oksigen di lingkungan). Untuk pertumbuhan *Actinobacillus* memerlukan kelembapan yang tinggi sehingga diperlukan kasa steril yang sudah dibasahi dengan air steril kemudian dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ atau *candle jar*. Bakteri famili Pasteurellaceae umumnya

bersifat *dysgonic* (bakteri dengan pertumbuhan yang lambat yaitu sekitar 48 jam). Koloni yang tumbuh umumnya berukuran kecil namun rapat dan menunjukkan adanya warna kehijauan. Pada bakteri *A. actinomycetemcomitans* menunjukkan adanya struktur khusus berbentuk bintang bersegi setelah diinkubasi selama kurang lebih 5-7 hari, dimana struktur ini menjadi ciri khas spesies ini diantara spesies *Actinobacillus* lainnya (Nuritasari *et al.*, 2007; de la Maza *et al.*, 2020).

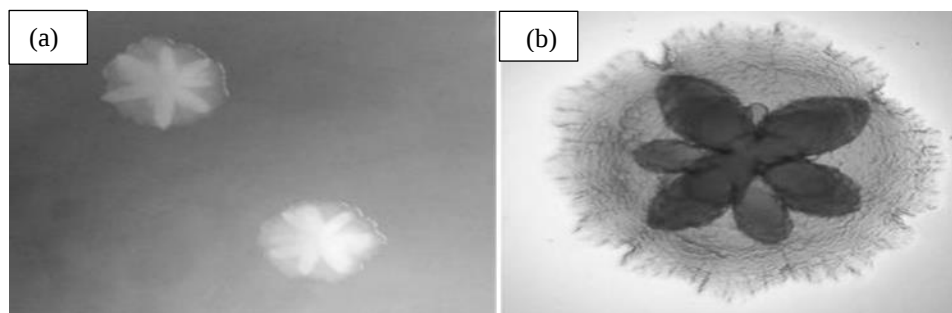
Koloni bakteri juga bersifat berlendir dan lengket sehingga sulit diambil dengan menggunakan *inoculating loop* (disebut juga ose/sengkelit merupakan jarum untuk inokulasi yang terbuat dari kawat nichrome atau platinum, digunakan untuk menginokulasi bakteri dari suatu media ke media lainnya). Sifat ini umumnya ditunjukkan saat proses isolasi bakteri dari sampel dan akan hilang setelah bakteri dikultivasi/dibiakan berulang kali (Garrity *et al.*, 2010).



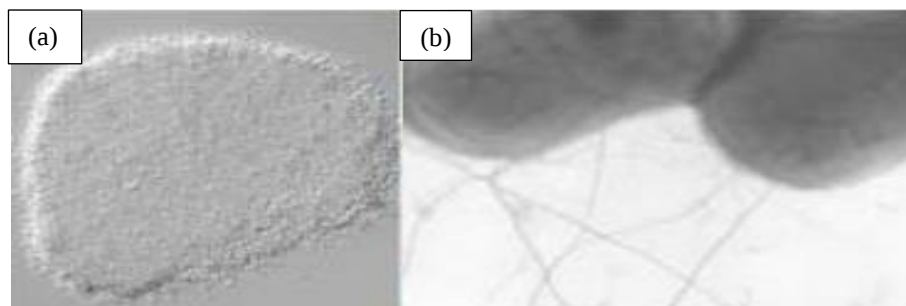
Gambar 2. Biakan bakteri *Actinobacillus* pada media agar darah; (a) *A. actinomycetemcomitans*, (b) *A. ureae*, (c) *A. hominis* (de la Maza *et al.*, 2020)

Pada medium cair, bakteri *Actinobacillus* (terutama *A. actinomycetemcomitans*) cenderung membentuk agregat (kumpulan) karena salah satu faktor virulensinya yaitu fibril panjang dan banyak pada seluruh permukaan sel dimana masing-masing fibril terdiri dari susunan pili yang juga berperan dalam proses adhesi disebabkan sifat bakteri ini cenderung menempel pada permukaan wadah kultur membentuk biofilm (suatu kumpulan mikroba yang melekat pada permukaan padat, permukaan tersebut berupa jaringan hidup maupun jaringan

mati) dan bersifat tahan terhadap proses homogenisasi yang kuat seperti *shaking* atau *vortex* (Gerakan cairan yang berputar cepat mengitari pusatnya). Medium kultur akan tetap bening dan hanya akan menjadi turbid (keruh) saat biofilm sudah bermaturasi, dimana turbiditas (tingkat kekeruhan) disebabkan oleh varian sel-sel yang tidak dapat menempel pada permukaan wadah. Oleh karena itu varian yang tidak dapat menempel umumnya digunakan sebagian besar untuk studi terhadap bakteri ini (Kachlany *et al.*, 2001; Irfan *et al.*, 2022).



Gambar 3. Koloni bakteri *A. actinomycetemcomitans* dengan struktur bintang pada bagian tengah koloni; (a) tampak atas, (b) tampak atas pada mikroskop (Gillepsie *et al.*, 2006).



Gambar 4. Sifat adheren bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada medium cair; (a) agregat bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada kultur cair, (b) fibril pada permukaan sel *A. actinomycetemcomitans* (Kachlany *et al.*, 2001).

3. Uji Identifikasi

Bakteri dapat diidentifikasi dengan serangkaian uji. Identifikasi spesies bakteri *Actinobacillus* satu sama lain atau dengan spesies bakteri dari genus lainnya dilakukan melalui uji biokimia dimana beberapa spesies memerlukan suplemen khusus untuk pertumbuhannya seperti faktor V (*Nicotinamide*

Adenine Dinucleotide/NAD terdapat dalam darah dan hanya bisa didapatkan dari eritrosit apabila telah lisis). *Actinobacillus* mampu memfermentasi karbohidrat dan mereduksi nitrat, urease positif. DNA genomik mengandung antara 40 dan 47% mol guanin ditambah sitosin. *Actinobacillus* juga dapat dibedakan dengan bakteri lainnya penyebab

endocarditis (infeksi pada lapisan bagian dalam jantung atau katup jantung.) yaitu bakteri kelompok HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter* / *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) melalui uji biokimia tertentu seperti uji oksidase (dilakukan untuk membantu mengidentifikasi kelompok bakteri dengan kemampuan bakteri melakukan oksidase yaitu menggunakan kertas oksidase strip dengan cara mengoleskan bakteri dalam cawan), uji katalase (menentukan kemampuan bakteri untuk mendegradasi hidrogen peroksida melalui produksi enzim katalase), uji reduksi nitrat, uji indol (menentukan kemampuan bakteri untuk mengoksidasi asam amino triptofan menjadi indol, hasil indol positif memperlihatkan cincin berwarna merah muda), urea, eskulin, xylose, laktose dan trehalose (Garritty *et al.*, 2010; Tille, 2017).

Isolasi dan identifikasi secara konvensional membutuhkan waktu lebih lama serta tenaga teknis yang terampil untuk mengerjakannya. Saat ini telah digunakan uji identifikasi menggunakan metode otomatis seperti pada VITEK® 2 compact otomatis sistem yang merupakan alat bersistem otomatis tinggi untuk uji identifikasi dan uji kepekaan (sensitifitas) antimikroba berdasarkan prinsip *Advanced Colorimetry* dan *Turbidimetry* sehingga memungkinkan hasil uji identifikasi dan uji kepekaan antimikroba yang sudah divalidasi dan diinterpretasikan sesuai dengan standar internasional CLSI (*Clinical laboratory Standard International*) selesai dalam waktu 5–8 jam dengan akurasi hasil berkisar kurang lebih 97,8%. Tahapan kerja meliputi persiapan dan pembakuan (standarisasi) kekeruhan inokulum, memasukkan data dengan sistem sandi batang (*barcode*) dan memasukkan kartu ke dalam alat VITEK® 2, selanjutnya seluruh proses penanaman (inokulasi), pemeraman (inkubasi), pembacaan, pengabsahan (validasi) dan penafsiran (interpretasi) hasil akan dilakukan secara otomatis oleh alat. Pemeriksaan yang sudah selesai dapat mengeluarkan hasil rekam cetak (print-out) secara otomatis, hasil dari

pemeriksaan ini juga dapat langsung terhubung dengan LIS (*Laboratory Information System*) yaitu perangkat lunak (*software*) yang menangani penerimaan, pemrosesan dan penyimpanan informasi yang dihasilkan oleh proses laboratorium medis (Prihatini *et al.*, 2007; Procop *et al.*, 2017).

4. Uji Kepekaan terhadap antibiotik

Saat ini belum ada panduan terkait uji kepekaan yang tepat untuk genus *Actinobacillus*. Kasus kekebalan/resistensi bakteri ini terhadap antibiotik juga belum banyak dilaporkan. Uji kepekaan dapat dilakukan dengan metode difusi cakram atau *paper disk* antibiotik (Metode Kirby-Bauer) untuk mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang tampak menunjukkan adanya kepekaan bakteri tersebut terhadap antibiotik yang di uji. Metode uji kepekaan lainnya yang dapat digunakan adalah metode dilusi tabung yaitu dengan melakukan pengenceran antibiotik dalam tabung tabung reaksi untuk menentukan KHM/MIC (Konsentrasi Hambat Minimal/*Minimum Inhibitory Concentration*)) dengan menggunakan media cair dan akan menentukan KBM/MBIC (Konsentrasi Bunuh Minimal/*Minimum Bactericidal Inhibitory*) dengan menggunakan media padat. Interpretasi hasil dari uji kepekaan tersebut mengikuti petunjuk tabel yang dibuat oleh CLSI (*The Clinical Laboratory Standards Institute*) sebagai parameter yang kemudian dimasukkan kedalam tiga kriteria kepekaan sesuai hasil yang didapat yaitu sensitif/peka, intermediate/kurang peka dan resisten/tidak peka atau kebal (Pratiwi, 2008, Faisal *et al.*, 2015). *Actinobacillus* diketahui bersifat sensitif terhadap *extended-spectrum* cephalosporin dan fluorokuinolon oleh karena itu antibiotik ini menjadi opsi terapeutik dalam kasus infeksi yang disebabkan oleh *Actinobacillus* (de la Maza *et al.*, 2020).

Berbeda dengan *A. actinomycetemcomitans* yang merupakan bakteri HACEK, uji kepekaan didasarkan pada dokumen CLSI M45, dimana *A. actinomycetemcomitans* ditumbuhkan pada *Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth* yang disuplementasi oleh *Lysed Horse Blood* (CAMHB-LHB) dengan konsentrasi inokulum bakteri setara dengan 0.5 McFarland ($1,2 \times 10^8$ CFU/*Colony Forming Unit*) menggunakan densitometer selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam. Alternatif media lainnya yaitu *Haemophilus Test Medium* (HTM) atau *Brucella Broth* yang disuplementasi dengan vitamin K (1 µg/mL), hemin (5 µg/mL) dan 5% LHB. Inkubasi dilakukan dalam kondisi anaerobik. Antibiotik yang umumnya diuji adalah ampicilin, amoksisilin-klavulanat, ceftriaxon atau cefotaxim, ciprofloxacin atau levofloxacin, imipenem, penisilin, trimetopim-sulfamethoxazol. Beberapa strain diketahui resisten terhadap penisilin dan ampicilin (CLSI, 2015).

5. Uji *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)

Metode *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) juga digunakan pada beberapa kasus dan menunjukkan hasil yang baik untuk proses deteksi cepat bakteri *Actinobacillus* pada spesimen. Metode LAMP merupakan alternatif dari metode PCR dengan tingkat sensitifitas yang sama namun menggunakan peralatan yang lebih sederhana. Deteksi dengan LAMP dilakukan secara isothermal sehingga tidak memerlukan mesin *thermocycler* sebagai tempat reaksinya tetapi cukup menggunakan inkubator *waterbath* saja. Pada metode LAMP tidak ada tahap denaturasi dan penempelan/*annealing* sebagaimana di PCR sehingga metode LAMP menjadi lebih cepat bila dibandingkan dengan PCR. Reaksi LAMP pada umumnya dilakukan selama satu jam, reaksi

positif dapat terlihat pada menit ke 40 atau ke 45 yang diamati dengan agarose elektroforesis dan pada menit ke 11 ketika menggunakan pengamatan *real time* terhadap tingkat kekeruhannya (turbiditas). Metode LAMP telah digunakan secara luas untuk deteksi suatu gen atau suatu mikroba melalui suatu sekuens spesifik bahan genetiknya serta mempunyai keunggulan dalam hal sensitifitas untuk mendeteksi satu gen namun kelemahannya adalah belum dapat menggantikan pekerjaan yang biasa dilakukan dengan PCR seperti mutagenesis dan kloning (Murwantoko, 2006; Henderson *et al.*, 2010).

6. Uji Hibridisasi

Metode lain yaitu hibridisasi juga dapat digunakan untuk menentukan kekerabatan spesies dengan spesies lainnya. Hibridisasi dapat berupa hibridisasi antar DNA, atau hibridisasi DNA dan rRNA. Prinsip pemeriksaan dari hibridisasi adalah DNA/RNA bakteri yang terdapat di dalam spesimen didenaturasi sehingga untai tunggal DNA/RNA akan berikatan secara komplementer dengan pelacak DNA spesifik berlabel radioaktif atau yang dimodifikasi secara kimiawi. Sinyal label yang digunakan akan dapat terdeteksi secara kualitatif atau kuantitatif. Metode lainnya yang dapat digunakan adalah ribotyping yaitu dengan memanfaatkan enzim-enzim restriksi untuk mendigesti DNA diikuti dengan pemisahan DNA dengan menggunakan elektroforesis agar, Analisis *fingerprinting* melalui teknik *restriction fragment-end-labeling* membagi strain-strain dalam spesies ke dalam beberapa tipe berdasarkan polimorfisme (mikroba atau spesies dapat memiliki banyak bentuk atau tahapan) (Garrity *et al.*, 2010; Yasmon *et al.*, 2012).

7. Uji PCR

Uji molekuler diperlukan untuk proses identifikasi bakteri *Actinobacillus* dari bakteri spesies lainnya. Identifikasi melalui pendekatan

molekuler dapat dilakukan melalui metode berbasis *Polymerase Chain-Reaction* (PCR) untuk mendeteksi bagian 16S rRNA bakteri. Teknik *Polymerase chain reaction* (PCR) dipakai sebagai salah satu metode uji alternatif karena hasilnya akurat, spesifik, cepat dan sensitif bila dibandingkan dengan uji menggunakan biakan/kultur, namun kelemahannya adalah bahwa uji ini memerlukan peralatan yang relatif mahal dan tenaga ahli. Pemanfaatan deteksi 16S rRNA didasarkan antara lain kehadirannya pada hampir semua jenis bakteri dalam bentuk famili multigen atau operon, fungsinya tidak berubah dari waktu ke waktu serta ukurannya yang besar (sekitar 1.500 bp) (Janda *et al.*, 2007).

Selain menggunakan PCR biasa, sistem PCR multiplex dikembangkan dimana primer spesifik untuk spesies *Actinobacillus* dan bakteri patogen lainnya pada sampel yang sama dideteksi dengan menggunakan reaksi PCR. Sistem ini juga menurunkan jumlah sel yang diperlukan untuk proses deteksi yaitu dari 1000 sel/ml menjadi 10 sel/ml. Namun, proses diagnosis dengan PCR hanya dapat mengetahui ada tidaknya bakteri *Actinobacillus* pada spesimen. Metode lainnya yang digunakan untuk proses kuantifikasi bakteri *Actinobacillus* yaitu dengan menggunakan *Real-Time PCR* (RT-PCR). Cara ini menggunakan mesin *real-time* PCR, Primer dan dNTP-nya dilabel dengan fluoresen, penggandaan fragmen spesifik dideteksi dengan sensor yang peka terhadap cahaya fluoresen sehingga hasil penggandaan fragmen spesifik dapat diikuti secara *real-time* berupa grafik pada layar monitor dan tahap penggandaan materi genetik dilakukan secara bersamaan. Pada saat ini *Real-Time* PCR masih dianggap paling sensitif, spesifik, lebih cepat dan akurat bila dibandingkan dengan tehnik PCR konvensional. Namun kelemahan dari pengujian dengan cara ini adalah memerlukan

peralatan yang relatif mahal serta membutuhkan keterampilan khusus atau tenaga terlatih untuk mengoperasikan mesin tersebut (Merk, 2009; Himawan *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2016).

KESIMPULAN

Actinobacillus adalah salah satu bakteri patogen oportunistik yang termasuk dalam kelompok Gram negatif. Spesies dari genus *Actinobacillus* menghuni berbagai macam host seperti mamalia, manusia dan lainnya. Bakteri ini merupakan mikrobiota oral manusia dan invasi dari spesies ini pada bagian gingiva menyebabkan periodontitis (infeksi gusi). Sama seperti manusia, spesies lain seperti *A. equuli* menyebabkan *sleepy foal disease* (penyakit anak kuda mengantuk) pada kuda dan *A. lignieresii* menyebabkan *wooden tongue* (penyakit lidah kaku) pada ruminansia dimana keduanya juga merupakan mikrobiota pada host tersebut. Bakteri-bakteri ini tumbuh lambat pada media pertumbuhan agar coklat dan agar darah serta membutuhkan waktu inkubasi kurang lebih 5-7 hari dengan kondisi pertumbuhan tinggi CO₂. Sel bakteri berbentuk basil namun tidak jarang dijumpai bentuk seperti kokus-basil dan granul ketika dilihat dibawah mikroskop. Uji kepekaan menunjukkan bakteri spesies ini masih peka terhadap antibiotik pada umumnya namun belum ada standar yang menjadi tetapan untuk pengukuran kepekaan antibiotik (kecuali *A. actinomycetemcomitans*). Pemeriksaan laboratorium yang dapat dilakukan untuk diagnosis bakteri genus *Actinobacillus* meliputi pemeriksaan mikroskopik, kultur/biakan, uji identifikasi, uji kepekaan terhadap antibiotik, deteksi bakteri ini juga dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknologi seperti *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), hibridisasi gen dan *Polymerase Chain-Reaction* (PCR).

DAFTAR PUSTAKA

- Amalina, R. (2009). Perbedaan Jumlah *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pada periodontitis agresif berdasarkan jenis kelamin. *J UNISSULA*, 49(124), 2009.
- Assavacheep, P., & Rycroft, A. (2013). Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Res Vet Sci*, 94(1), 22-26.
- Bauman, R.W. (2011). *Microbiology with Diseases by Taxonomy* (3rd ed.). San Francisco: Pearson Education.
- Bulele, T., Rares, F., & Porotu'o, J. (2019). Identifikasi Bakteri dengan pewarnaan gram pada penderita infeksi mata luar di rumah sakit Kota Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 7(1), 30-36.
- Cappucino, J.G. (2005). *Microbiology, a Laboratory Manual* (7th ed.). USA: Perason Benjamin Cummings.
- Carranza, F., Newman, M., & Takei, H. (2006). *Carranza's Clinical Periodontology* (10th ed.). Philadelphia: BW Saouders.
- Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., & Mietzner, T. (2016). *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology* (27th ed.). New York: Mc Graw Hill education.
- Chapa, A.C., Herrera, G.M., Enriquez, A.M., Trejo, C.S., Rodriguez, J.C., Najera, R.I., & Soto, J.M. (2021). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An orthodontic approach. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 7(3), 40-43.
- CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. (2015). M45-methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria (Vol. 35). In: <https://clsi.org>
- De la Maza, L., Pezzlo, M., Bittencourt, C., & Peterson, E. (2020). Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press. doi:10.1128/9781683671077
- Feisal, M., Fatimawali, & Wewengkang, D. (2015). Uji kepekaan bakteri yang diisolasi dan diidentifikasi dari sputum penderita bronkhitis di RSUP Prof.DR.R.D Kandou Manado terhadap antibiotik golongan sefalosporin (Sefiksim), Penisillin (Amoksisilin) dan tetrasiklin (Tetrasiklin). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 4(3), 88-95.
- Garrity, G., Bell, J., Lilburn, T., & Famliy, I. (2010). *Pseudomonadaceae*. *Bergey's Man Syst Bacteriol*, 2B, 323-379. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697963>
- Gillespie, S.H., & Hawkey, P.M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (Second Edition ed.). New Jersey: Willey Publisher
- Goering, R.V., Dockrell, H.M., Zuckerman, M., & Chiodini, P.L. (2019). *Mims Medical Microbiology and Immunology* (6th ed.). London: Elsevier.
- Henderson, B., Ward, J., & Ready, D. (2010). *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A periodontopathogen? *Periodontology*, 54, 78-105.
- Himawan, A., Sumardiyono, Y.B., Somowiyarjo, S., Trisyono, Y.A., & Beattie, A. (2010). Deteksi menggunakan PCR (Polimerase Chain Reaction) *Candidatus liberibacter asiaticus*, penyebab huanglongbing pada jeruk siem dengan beberapa gejala pada daun. *J.PHT Tropika*, 10(2), 178-183.
- Irfan, M., Rudhanton, Diah, & Septina, F. (2022). Ekstrak teh putih sebagai penghambat biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (in vitro). *E-Prodenta Journal of Dentistry*, 6(1), 534-538.
- Janda, J., & Abbott, S. (2007). rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2761-2764.
- Joshiyura, V., Yadalam, U., & Brahmavas, B. (2015). Aggressive periodontitis. a review

- Journal of the internasional Clinical dental Research organization*, 7(1), 11-17.
- Kachlany, S., Planet, P., DeSalle, R., Fine, D., & Figurski, D. (2001). Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: From plaque to plaque to pond scum. *Trends Microbiol*, 9(9), 429-437.
- Levinson, W. (2008). *Review of Medical Microbiology and Immunology*. New York: The McRraw-Hill Companies, Inc.
- Markou, E., Eleana, B., Lazaros, T., & Antonios, K. (2009). The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. *Open Dentistry Journal*, 114-119.
- Martinez, J. (2014). Short-sighted evolution of bacterial opportunistic pathogens with an environmental origin. *Front Microbiol*, 5(May), 1-4.
- Merck. (2009). Metode cepat dan akurat deteksi bakteri patogen menggunakan real-time PCR. Foodproof Biotecon.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., & Pfaller, M.A. (2016). *Medical Microbiology* (8th ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Murwantoko. (2006). Metode Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) dan aplikasinya untuk deteksi penyakit ikan (Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method and its application for fish pathogen detection. *Jurnal Perikanan (J.Fish,Sci)*, VIII(1), 1-8.
- Nuritasari, D., Sarjono, P.R., & Aminin, N.A. (2007). Isolasi bakteri termofik sumber air panas Godongsongo dengan media pengaya MB (Minimal Broth) dan TS (Taoge Sukrosa) serta identifikasi fenotif dan genotif. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 20(2), 84-91.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Prihatini, Aryati, & Hetty. (2007). Identifikasi cepat mikroorganisme menggunakan alat Vitex-2 (Rapid identification of microorganism by Vitex-2). *Indonesia Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 13(3), 129-132.
- Procop, G.W., Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W.M., Koneman, E.W., Schreckenberger, P.C., & Woods, G.L. (2017). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (7th ed.). Philadelphia: Wolter Kluwer Health.
- Riccardi, N., Rotulo, G., & Castagnola, E. (2019). Defenition of opportunistic infections in immunocompromised children on the basis of etiologies and clinical features: a summary for practical purposes. *Curr Pediatr Rev*, 15(4), 197-206.
- Rini, C.S., & Rohmah, J. (2020). *Buku Ajar Mata Kuliah Bakteriologi Dasar*. Sidoarjo: UMSIDA Press.
- Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2013). The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Pulished online 2013:1-768. doi:10.1007/978-3-642-38922-1
- Rylev, M., & Killian, M. (2008). Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol*, 35(8), 346-361.
- Talaro, K., & Chess, B. (2019). *Foundations in Microbiology* (10th ed.). McGraw-Hill Education.
- Tille, P. (2017). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* (14th ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Tremblay YDN, Levesque, C., Segers, R., & Jacques, M. (2013). Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet Res*, 9, 2013.
- Yasmon, A., & Dewi, B.E. (2012). Penuntun Praktikum Mikrobiologi Kedokteran. In *Diagnosis molekuler penyakit infeksi*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.