

PERBANDINGAN PERTUMBUHAN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* PADA AGAR COKLAT BERBASIS *BLOOD AGAR*, *TRYPTIC SOY AGAR* DAN *COLUMBIA AGAR*

Triyoga Sulistyaningsih¹, Rebriarina Hapsari², Helmia Farida²

¹ Mahasiswa Program S-1 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Ilmu Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang: *H. influenzae* merupakan bakteri yang sulit ditumbuhkan dan memerlukan nutrisi dan lingkungan yang khusus (*fastidious*) meskipun ditumbuhkan pada media standarnya yaitu agar coklat. Modifikasi basis media adalah salah satu cara untuk meningkatkan pertumbuhan koloni *H. influenzae*.

Tujuan: Menganalisis perbandingan pertumbuhan *H. influenzae* pada agar coklat dengan basis media *blood agar*, TSA dan *columbia agar*

Metode: Isolat murni *H. influenzae* yang disimpan pada STGG di -80°C ditanam pada media agar coklat dengan basis media *blood agar*, TSA dan *columbia agar*. Media yang telah ditanami sampel diinkubasi pada suhu 37°C dengan tekanan CO₂ 5%, kemudian diamati setelah diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Diameter koloni diukur menggunakan *ruler* di *Adobe photoshop* dan analisis data yang dilakukan adalah uji *one-way Anova* dan dilanjutkan dengan *post-hoc* untuk diameter koloni dan uji *chi square* untuk zona pertumbuhan dan karakteristik koloni

Hasil: Diameter koloni pada basis media TSA dalam 24 jam dan 48 jam (2,31±0,58 dan 3,02±0,77 mm) tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan basis media *blood agar* (2,20±0,69 dan 2,34±0,96 mm) dan *columbia agar* (2,04±0,59 dan 2,55±0,67 mm) dengan p = 0,650 (24 jam) dan p = 0,440 (48 jam). Tidak ada perbedaan bermakna juga ditemui pada zona pertumbuhan dengan p = 0,638 (24 jam) dan p = 0,342 (48 jam) serta karakteristik koloni.

Kesimpulan: Modifikasi media dengan mengganti basis media dengan TSA dan *columbia agar* tidak meningkatkan kemampuan media dalam menumbuhkan *H. influenzae*.

Kata kunci: *H. influenzae*, agar coklat, TSA, *columbia agar*, *blood agar*

ABSTRACT

THE COMPARISON OF GROWTH OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* IN CHOCOLATE AGAR WITH *BLOOD AGAR* BASE, *TRYPTIC SOY AGAR* AND *COLUMBIA AGAR*

Background: *Haemophilus influenzae* needs specific nutrition and condition and is difficult to be cultured even in its standard media, chocolate agar. Modification of mediabase was predicted could enhance the growth of *H. influenzae*.

Aim: To analyse the comparison of growth of *H. influenzae* in chocolate agar with *blood agar* base, TSA and *columbia agar* base.

Method: Pure isolate stock in STGG medium were cultured in chocolate agar with *blood agar* base, TSA base and *Columbia agar* base. The streaked media was incubated in 37°C and CO₂ 5%, and observed after 24 hours and 48 hours. Diameter of the colonies was measured using

ruler from Adobe photoshop. Data were analysed using one-way Anova for diameter and chi-square for zone of growth and characteristic of colony.

Result: There was no significant differences on diameter, number and characteristics of the colonies among *H. influenzae* cultured for 24 hours and 48 hours in TSA ($2,31\pm 0,58$ mm and $3,02\pm 0,77$ mm), blood agar ($2,20\pm 0,69$ mm and $2,34\pm 0,96$ mm) and Columbia agar ($2,04\pm 0,59$ mm and $2,55 \pm 0,67$ mm) base chocolate agar with $p = 0,650$ (24 hours) and $p = 0,440$ (48 hours) for diameters and $p = 0,638$ (24 hours) and $p = 0,342$ (48 hours) for zone of growth

Conclusion: Media modification by replacing mediabase from blood agar to TSA and Columbia agar didn't enhance ability of media in *H. influenzae* culture.

Keywords: *H. influenzae*, chocolate agar, TSA, columbia agar, blood agar

PENDAHULUAN

Meningitis bakterial adalah inflamasi yang terjadi di bagian meninges akibat infeksi bakteri. *H. influenzae* teridentifikasi sebagai salah satu penyebab utama meningitis bakterial pada anak dengan insiden per tahun sebesar 0,2.^{1,2} dan *H. influenzae* tipe b (Hib) teridentifikasi sebagai satu dari tiga penyebab tersering³

Haemophilus influenzae merupakan bakteri patogen pada manusia yang dapat menyebabkan meningitis, pneumonia dan bakteremia⁴. *H. Influenzae* memiliki rentang patogenisitas yang luas, mulai dari penyakit invasif seperti meningitis hingga membentuk kolonisasi yang komensal di saluran pernapasan atas.⁵ Vaksin terhadap Hib berhasil mengurangi kasus meningitis akibat Hib, namun, beberapa penelitian menunjukkan munculnya penyakit invasif yang serius akibat *H. influenzae* tipe lain.⁶

Aspek penting dalam terapi awal adalah dengan antimikrobal, penanganan yang terlambat dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas penyakit.³ Identifikasi bakteri penyebab penyakit penting untuk menentukan terapi yang efektif, namun, *H. influenzae* sulit ditumbuhkan dan merupakan bakteri *fastidious*, yaitu bakteri yang pertumbuhannya memerlukan nutrisi dan lingkungan yang khusus. *H. influenzae* tumbuh pada suhu 35-37°C dengan konsentrasi CO₂ 5%-10% dan membutuhkan hemin (faktor X) dan NAD (*nicotinamide-adenine-dinucleotid*) atau (faktor V) untuk pertumbuhannya. Dalam kondisi tersebut, membutuhkan paling tidak dua puluh empat jam untuk bakteri *H. influenzae* ini membentuk koloni.⁷

Media yang biasa digunakan untuk pertumbuhan *H. influenzae* adalah agar coklat dari *blood agar base*. *Blood agar base* pada suhu 80°C dicampurkan dengan

darah yang kemudian akan menghasilkan warna kecoklatan sehingga disebut agar coklat. Darah yang biasa digunakan adalah darah domba atau darah kuda. Pemanasan dalam proses pembuatan agar coklat akan meng-inaktivasi *V factor inactivating enzyme* dan melepaskan NAD atau faktor V dari darah ke dalam media. Hemin telah tersedia dalam sel darah, baik yang mengalami hemolisis maupun yang tidak.⁸

Basis media yang juga dapat digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri *H. influenzae* adalah *Tryptic Soy Agar (TSA) base* dan *Columbia agar base*. TSA sendiri tanpa penambahan apapun tidak memiliki faktor X dan V⁹. TSA memiliki 2 jenis pepton sehingga dapat menghasilkan lebih banyak nitrogen dibandingkan dengan *blood agar* biasa yang hanya memiliki satu jenis pepton.^{11,12} *Columbia agar* mengandung *special peptone* kasein hidrosilat dan *meat infusion meat*, sedangkan *blood agar* biasa hanya mengandung salah satunya.¹³

Kedua basis media tersebut memiliki komposisi yang lebih bernutrisi dibandingkan dengan *blood agar*, namun, belum ada penelitian yang membandingkan pertumbuhan koloni bakteri *H. influenzae* pada agar coklat berbasis *blood agar (blood agar base)*, *TSA base* dan *columbia agar base*.

METODE

Penelitian eksperimental dengan rancangan *true experimental post-test only* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan Juni sampai Agustus 2017. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *H. influenzae* tipe a, b, c, d, e, f dan NTHi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah isolat murni yang teridentifikasi sebagai bakteri *H. influenzae* dan telah disimpan selama kurang dari satu tahun. Kriteria eksklusi terdapat kerusakan dan kontaminasi *tube* penyimpanan isolat murni.

Sampel diambil dengan cara *consecutive sampling*. Berdasarkan rumus besar sampel didapatkan minimal 9 sampel tiap kelompok. Pengambilan data dilakukan dengan melakukan penanaman sampel pada media yang diujikan. Kemudian, pertumbuhan koloni *H. influenzae* diamati dengan melihat karakteristik, zona pertumbuhan koloni dan diameter koloni.

Variabel bebas penelitian ini adalah jenis media, sedangkan variabel terikat penelitian ini adalah karakteristik koloni, zona pertumbuhan koloni dan diameter koloni. Dari data yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji Saphiro-Wilk. Uji normalitas data untuk

diameter koloni menunjukkan distribusi normal, sehingga uji hipotesis untuk diameter koloni (variabel numerik) menggunakan uji *one-way Anova*, sedangkan uji normalitas untuk zona pertumbuhan koloni dan karakteristik koloni menunjukkan distribusi tidak normal sehingga uji hipotesis untuk zona pertumbuhan koloni dan karakteristik koloni (variabel kategorik) menggunakan uji *Chi-square*.

Penelitian ini telah mendapatkan *ethical clearance* dari KEPK FK Undip / RSUP Dr. Kariadi Semarang

HASIL

Penelitian dilakukan dengan pengambilan data primer berupa koloni bakteri *H. influenzae* yang tumbuh pada media yang diujikan. Pengambilan data dilakukan pada bulan Juli hingga Agustus. Data diambil pada pengamatan selama 24 jam dan 48 jam.

Hasil pengamatan karakteristik koloni pada agar coklat berbasis *blood agar*, TSA dan *columbia agar* pada pengamatan 24 dan 48 jam

Karakteristik koloni dinilai dari ada tidaknya karakteristik *H. influenzae* pada koloni yang tumbuh pada media yang diuji.

Tabel 1. Karakteristik koloni pada pengamatan 24 jam

Karakteristik Koloni pada 24 jam	Basis Media		
	Agar Coklat Berbasis <i>Blood agar</i>	Agar Coklat Berbasis TSA	Agar Coklat Berbasis <i>Columbia agar</i>
	N (%)	N (%)	N (%)
Terdapat Gambaran Karakteristik	9 (100.0)	9 (100.0)	9 (100.0)
Tidak Terdapat Gambaran Karakteristik	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Karakteristik Koloni pada 48 jam	Basis Media		
	Agar Coklat Berbasis <i>Blood agar</i>	Agar Coklat Berbasis TSA	Agar Coklat Berbasis <i>Columbia agar</i>
	N (%)	N (%)	N (%)
Terdapat Gambaran Karakteristik	9 (100.0)	9 (100.0)	9 (100.0)
Tidak Terdapat Gambaran Karakteristik	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Dari hasil analisis yang didapatkan dari data karakteristik koloni pada pengamatan 24 dan 48 jam terlihat bahwa terdapat gambaran karakteristik koloni *H. influenzae* yaitu berwarna keabu – abuan dan *opaque* atau berkilau transparan dan memiliki bau khas “*mousy odor*” pada semua media dan sama sekali tidak terdapat perbedaan.

Hasil pengamatan zona pertumbuhan koloni pada agar coklat berbasis *blood*

Tabel 2. Zona pertumbuhan koloni pada 24 dan 48 jam

Jumlah	Tidak terdapat koloni yang tumbuh n(%)	Terdapat koloni pada zona 1 n(%)	Terdapat koloni pada zona 1 dan 2 n(%)	Terdapat koloni pada zona 1, 2 dan 3 n(%)	Terdapat koloni pada zona 1,2, 3 dan 4 n(%)
24 Jam					
- Agar Coklat Berbasis <i>Blood agar</i>	-	-	-	4 (44,4%)	5 (55,6%)
- Agar Coklat Berbasis TSA	-	-	-	5 (55,6%)	4 (44,4%)
- Agar Coklat Berbasis <i>Columbia agar</i>	-	-	-	3 (33,3%)	6 (66,7%)
48 Jam					
- Agar Coklat Berbasis <i>Blood agar</i>	-	-	-	4 (44,4%)	5 (55,6%)
- Agar Coklat Berbasis TSA	-	-	-	5 (55,6%)	4 (44,4%)
- Agar Coklat Berbasis <i>Columbia agar</i>	-	-	-	2 (22,2%)	7 (77,8%)

Dari tabel diatas terlihat bahwa zona pertumbuhan koloni pada inkubasi 24

***agar*, TSA dan *columbia agar* pada pengamatan 24 dan 48 jam**

Uji untuk menganalisis data zona pertumbuhan koloni adalah dengan menggunakan uji *Fisher* karena syarat uji *Chi-square* tidak terpenuhi. Hasil pengamatan zona pertumbuhan koloni pada 24 dan 48 jam disajikan pada tabel 8.

jam dan 48 jam pada pengamatan di laboratorium tidak menunjukkan

perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,638$ pada 24 jam dan nilai $p = 0,342$ pada 48 jam.

Hasil Pengukuran Diameter Koloni pada Pengamatan 24 dan 48 Jam

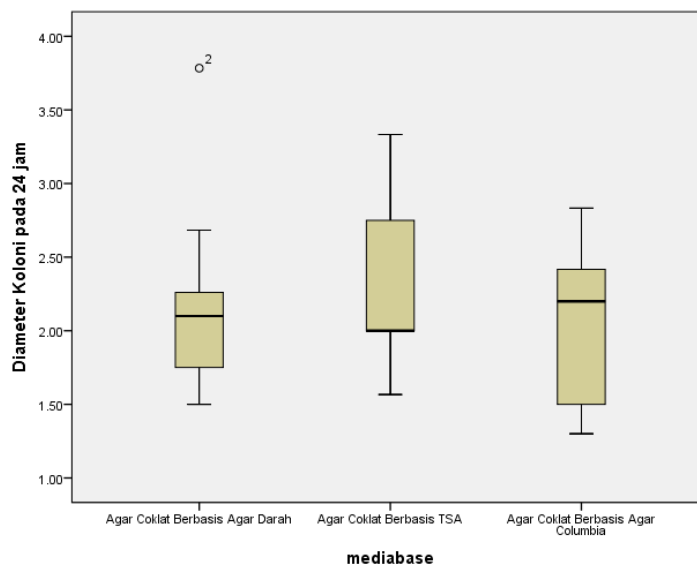
Untuk analisis data dilakukan uji *one-way Anova* dan dilanjutkan uji *PostHoc*. Rerata dan simpang baku ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Diameter Koloni

Karakteristik	Rerata±SB	P
Diameter Koloni 24 Jam		0,650
Agar coklat berbasis <i>blood agar</i>	2,20 ± 0,69	
Agar coklat berbasis TSA	2,31 ± 0,58	
Agar coklat berbasis <i>Columbia agar</i>	2,04 ± 0,59	
Diameter Koloni 48 Jam		0,440
Agar coklat berbasis <i>blood agar</i>	2,34 ± 0,96	
Agar coklat berbasis TSA	3,02 ± 0,77	
Agar coklat berbasis <i>Columbia agar</i>	2,55 ± 0,67	

Hasil analisis diameter koloni yang tumbuh pada media agar coklat berbasis *blood agar*, TSA dan Columbia dalam

waktu 24 jam ditampilkan pada grafik berikut :

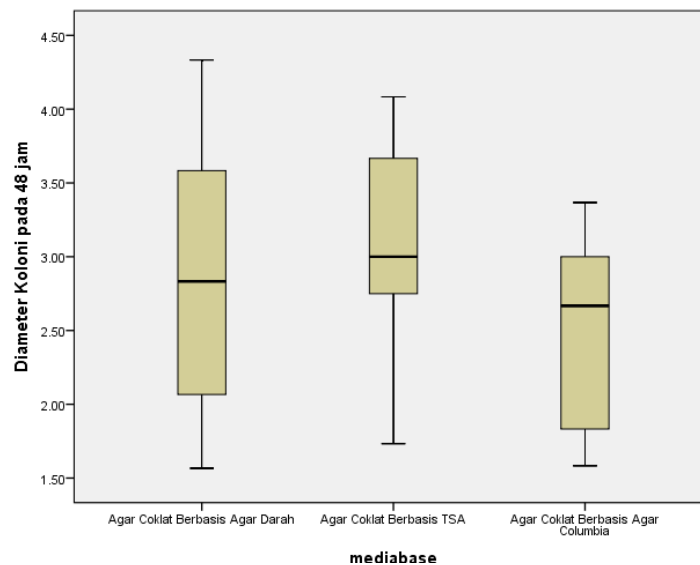


Gambar 1. Diameter Koloni pada 24 jam

Dari grafik terlihat bahwa pada inkubasi 24 jam, diameter koloni *H.influenzae* pada agar coklat berbasis TSA ($2,31 \pm 0,58$) tidak lebih besar dibandingkan dengan agar coklat berbasis *blood agar* ($2,20 \pm 0,69$) maupun *columbia*

agar ($2,04 \pm 0,59$) dan secara statistik tidak signifikan dengan $p = 0,650$.

Hasil analisis diameter koloni yang tumbuh pada media agar coklat berbasis *blood agar*, TSA dan Columbia dalam waktu 48 jam ditampilkan pada grafik berikut:



Gambar 2. Diameter Koloni pada 48 jam

Dari grafik dapat dilihat bahwa pada inkubasi 48 jam, diameter koloni *H.influenzae* pada agar coklat berbasis TSA ($3,02 \pm 0,77$) tidak memiliki perbedaan bermakna dengan agar coklat berbasis *blood agar* ($2,34 \pm 0,96$) maupun *columbia agar* ($2,55 \pm 0,67$) dengan $p = 0,440$.

PEMBAHASAN

Penggunaan TSA dan *Columbia agar* sebagai *mediabase* pada agar coklat ditujukan untuk memperkaya nutrisi pada

media untuk pertumbuhan *H. influenzae* sehingga lebih mudah dideteksi keberadaannya pada sampel. Penelitian ini membandingkan pertumbuhan *H. influenzae* pada agar coklat dengan basis media *blood agar*, TSA dan *Columbia agar* dilihat dari diameter, zona pertumbuhan koloni dan karakteristiknya untuk mengetahui basis media yang paling baik dalam kultur bakteri tersebut.

H. influenzae yang ditanam pada ketiga media tumbuh dengan baik dengan karakteristik yang sesuai. Zona

pertumbuhan koloni *H. influenza* dilihat dari ada tidaknya koloni yang tumbuh pada tiap zona. Koloni *H. influenzae* pada ketiga media tumbuh hingga zona 3 dan 4.

Dalam penelitian yang membandingkan agar coklat darah manusia dengan dan tanpa pencucian eritrosit, didapatkan bahwa zona pertumbuhan dan karakteristik koloni tidak mengalami perbedaan yang signifikan.³⁰ zona pertumbuhan dan karakteristik koloni yang tidak mengalami perbedaan ini senada dengan penelitian sebelumnya yang menilai densitas koloni dalam plate agar coklat untuk membandingkan agar coklat yang berbahan dasar darah domba dan darah kuda. Zona pertumbuhan koloni yang ditemukan pada coklat agar dari *blood agar* domba dan darah kuda hampir sama. Karakteristik koloni yang ditemukan pun menunjukkan hasil yang sama. Zona pertumbuhan dan karakteristik koloni dinilai untuk mengetahui apakah *H. influenzae* dapat tumbuh baik dengan karakteristik yang tetap terjaga.³⁹

Pada tabel 3 dapat dilihat bahwa tidak terdapat perbedaan diameter secara signifikan antara agar coklat berbasis *blood agar*, agar TSA dan *columbia agar*. Waktu pengamatan 48 jam tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan pengamatan 24 jam, namun, penelitian sebelumnya

yang meneliti efek dari basis media terhadap hasil dari tes satelit *H. influenzae*¹⁶ menunjukkan pertumbuhan optimum *H. influenzae* setelah diinkubasi selama 48 jam. Dalam penelitian tersebut, *plate* agar coklat yang tidak ditemukan koloni *H. influenzae* pada pengamatan 24 jam diinkubasi kembali, dan saat pengamatan 48 jam didapatkan koloni yang tumbuh.¹⁶

Tidak seperti *S. pneumoniae* yang memiliki autolisin, *H. influenzae* tidak memiliki mekanisme autolisis, namun pada sebuah penelitian yang meneliti media untuk memelihara hasil kultur *H. influenzae*, didapatkan bahwa waktu hidup *H. influenzae* pada coklat agar terbatas selama 3 hari.⁴² Untuk identifikasi lebih jelas mengenai serotipe pada *H. influenza* dideteksi dengan reaksi aglutinasi²⁴ atau dengan metode PCR⁴³

Salah satu yang mempengaruhi pertumbuhan *H. influenzae* adalah nutrisi dari basis medianya. Agar coklat berbasis TSA menghasilkan nitrogen paling banyak jika dibandingkan dengan agar coklat berbasis *blood agar* dan *columbia agar*. Agar coklat berbasis TSA memiliki *soypeptone* dan *triptone* yang masing – masing menghasilkan nitrogen sebanyak 8,7% dan 12,7% serta asam amino triptofan yang dapat diubah menjadi NAD.

Agar coklat berbasis *blood agar* memiliki *proteose peptone* yang menghasilkan 12,7% nitrogen, sedangkan agar coklat berbasis Columbia memiliki *special peptone* yang menghasilkan 11,7% nitrogen.¹² Nitrogen yang lebih banyak pada media agar coklat berbasis TSA dibandingkan dengan agar coklat berbasis *blood agar* dan agar coklat berbasis Columbia ternyata tidak menunjukkan perbedaan pertumbuhan koloni yang signifikan.

Diameter koloni *H. influenzae* pada umumnya tumbuh sebesar 1–3 mm.⁴⁰ Hal ini sesuai dengan penelitian ini dimana rata-rata diameter pada masing-masing media berada dalam rentang ukuran 1-3 mm. Diameter koloni pada agar coklat berbasis TSA dengan *blood agar* domba pada penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang menggunakan TSA untuk mengoptimalkan pertumbuhan *H. influenzae* pada agar coklat dari darah manusia (2,31 mm vs 1,23 mm) pada 24 jam dan (3,02 mm vs 2,41 mm) pada 48 jam.¹⁵ Hal ini menunjukkan bahwa jenis darah mempengaruhi pertumbuhan *H. influenzae* dan penggunaan darah domba menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan darah manusia. Darah manusia memiliki sistem

komplemen dan antibodi yang menghambat pertumbuhan *H. influenzae*. Beberapa *strain* memiliki kapsul polisakarida, dimana dalam darah manusia terdapat antikapsular antibodi.²⁴ Adanya aktivasi komplemen mengakibatkan aktivasi protein pada permukaan sel bakteri sehingga terbentuk *membrane attack complex*.⁴¹

Basis media tidak mempengaruhi kualitas pertumbuhan bakteri *H. influenzae*, sehingga ketiga basis media dapat digunakan untuk kultur bakteri *H. influenzae*. Dilihat dari harganya, TSA dan *blood agar* memiliki harga yang relatif sama dan lebih murah dibandingkan dengan *columbia agar*. TSA juga merupakan media yang dapat digunakan untuk kultur berbagai jenis bakteri baik aerob maupun anaerob,³⁵ sehingga penggunaan TSA lebih disarankan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Meisadona G, Soebroto AD, Estiasari R. Diagnosis dan Tatalaksana Meningitis Bakterialis. Cdk-224. 2015;42(1):15–9.
2. Chandrasekar PH. Haemophilus Meningitis [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 7]. p. 14. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1164916-overview>

3. Chandrasekar PH, Singh NN. Haemophilus meningitis: Background, Pathophysiology, Etiology [Internet]. Medscape; 2016. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1164916-overview>
4. Kuhnert P, Christensen H. Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects. Kuhnert, Peter; Christensen, Henrik (eds.) (2008). Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects [Edited Textbook] . Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2008. 267 p.
5. Nørskov-lauritsen N, Nørskov-lauritsen N. Significance of Haemophilus and Aggregatibacter Species with Host Specificity for Humans Classification , Identification , and Clinical Significance of Haemophilus and Aggregatibacter Species with Host Specificity for Humans. 2014;
6. Sadeghi-Aval P, Tsang RSW, Jamieson FB, Ulanova M. Emergence of non-serotype b encapsulated Haemophilus influenzae as a cause of pediatric meningitis in northwestern Ontario. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2013;24(1):13–6.
7. Levine OS, Schuchat A. Generic protocol for population-based surveillance of Haemophilus influenzae type B global programme for vaccines and immunization. Glob Program Vaccines Immun Vaccine Res Dev. 1996;21.
8. Prior P. CHAPTER 9 Identification and Characterization of Haemophilus influenzae. 2012;2:1–19. Available from: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html>
9. Murray PR, Baron EJ, American Society for Microbiology. P, Whittier S. Manual of clinical microbiology. Manual of clinical microbiology. 2012. 513 p.
10. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia Harper. 25th ed. Bani AP, Sikumbang TM., editors. Jakarta: EGC; 2003. 600-602 p.
11. Oxoid. Dehydrated Culture Media Blood Agar Base Product Detail [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 3]. Available from: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0271&org=153&c=uk&lang=EN
12. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4th ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2010. 2-3 p.

13. Oxoid. Dehydrated Culture Media Columbia Blood Agar Detail Product [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 3]. p. 1–3. Available from: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0331&org=153&c=uk&lang=en
14. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, Islam M, Arifeen SE, Santosham M, et al. Addition of isovitalex in chocolate agar for the isolation of Haemophilus influenzae. *Indian J Med Res.* 2009;129(1):99–101.
15. Maharani N. Penggunaan Tryptic Soy Agar Untuk Mengoptimalkan Pertumbuhan Haemophilus Influenzae Pada Agar Coklat Dari Darah Manusia. 2011;
16. Doern G V., Chapin KC. Laboratory identification of Haemophilus influenzae: Effects of basal media on the results of the satellitism test and evaluation of the RapID NH system. *J Clin Microbiol.* 1984;20(3):599–601.
17. Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology [Internet]. Winconsin: Madison Publishing; 2008. 582 p. Available from: <http://rd.springer.com/article/10.1007/BF03175067#>
18. Public Health Image Library. Photomicrograph of Haemophilus Influenzae as seen using a Gram - stain Technique [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/hidisease/about/photos.html#>
19. National Center for Biotechnology Information. Haemophilus influenzae [Internet]. [cited 2017 Mar 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
20. Brooks GF, Carroll KC, Butel J, Morse SA, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. United States: McGraw-Hill; 2013. 265-267 p.
21. Champoux JJ, Drew WL, Neidhardt FC, Plorde JJ. An Introduction to Infectious Disease. 4th ed. Ryan KJ, Ray GC, editors. Sherris Medical Microbiology. United States: McGraw-Hill; 2004. 395-396 p.
22. Louisiana Dept of Health & Hospitals. HEMOPHILUS INFLUENZAE INVASIVE DISEASE. 2012;55(Infectious Disease Epidemiology Section):1–6.
23. Tikhomirova A, Kidd SP. Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae: Living

- together in a biofilm. *Pathog Dis.* 2013;69(2):114–26.
24. Musher DM. *Haemophilus Species*. In: S B, editor. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2017 Mar 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8458/>
25. Magazine QD. Best Practices for Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Diagnosing *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* Disease and Public Health Importance of Identifying Serotype/Serogroup [Internet]. National Center for Immunisation and Respiratory Disease. 2016 [cited 2017 Mar 6]. p. 4–6. Available from: <https://www.cdc.gov/meningococcal/laboratory/pcr-guidance-mening-hflu.html>
26. Dorlands Medical Dictionary for Health Consumers. factor X for *Haemophilus* [Internet]. 2007 [cited 2017 Mar 29]. Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/factor+X+for+Haemophilus>
27. Lee JM, Lee WH, Kay HY, Kim ES, Moon A, Kim SG. Hemin, an iron-binding porphyrin, inhibits HIF-1 α induction through its binding with heat shock protein 90. *Int J Cancer.* 2012;130(3):716–27.
28. Kilian M. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Denmark: John Wiley & Sons, Inc; 2015. 5-7 p.
29. Goldman E, Green LH, editors. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2009. 521 p.
30. Pradhana TA. Pencucian Eritrosit Darah Manusia Untuk Mengoptimalkan Pertumbuhan *Haemophilus Influenzae* Pada Media Agar Coklat Dari Darah Manusia Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Universitas Diponegoro. E-prints Undip. 2011;
31. Segen's Medical Dictionary. Chocolate Agar [Internet]. [cited 2017 Apr 2]. Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/chocolate+agar>
32. Bagaskoro R. Pengaruh Peningkatan Kadar Hemoglobin Terhadap Pertumbuhan *Haemophilus Influenzae* Pada Media Agar Coklat Dari Darah Manusia. 2011;
33. Forbes BA, Sahm DA, Weissfeld AS,

- Brown IA. Study Guide for Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. twelfth. Missouri: MOSBY ELSEVIER; 2007. 82 p.
34. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis Jr G. Textbook of Diagnostic Microbiology. fifth. Missouri: Saunders; 2015. 992 p.
35. Oxoid. Dehydrated Culture Media Tryptone Soya Agar Detail Product. 2017;1–2. Available from: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0131&c=UK&lang=EN&org=&print=N
36. Laboratorios Conda. SOY PEPTONE CAT N° : 1608 Ingredients (Peptones) [Internet]. [cited 2017 Apr 2]. p. 1–2. Available from: www.condalabs.com
37. Lab M. Typical analysis [Internet]. Vol. 6. 2013 [cited 2017 Apr 2]. p. 6–7. Available from: <http://www.labm.com/products/tryptone.asp>
38. Clontz L. Microbial Limit and Bioburden Tests : Validation Approaches and Global. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2009. 30 p.
39. Gratten M, Battistutta D, Torzillo P, Dixon J, Manning K. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae from upper respiratory tract secretions. J Clin Microbiol. 1994;32(11):2871–2.
40. Parija SC. Textbook of Microbiology & Immunology. 2nd ed. Elsevier Health Science; 2012.
41. Hallström T, Riesbeck K. Haemophilus influenzae and the complement system. Trends Microbiol. 2010;18(6):258–65.
42. Srikanth N, Macaden R. Chocolate Glycerol Broth for Maintenance of Haemophilus influenzae. Indian J Med Microbiol. 2003;21:221.
43. Greenwood D, et al. Medical microbiology : a guide to microbial infections : pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control [Internet]. xvi. Edinburgh, New York: Churcill Livingstone/Elsevier; 2012. 778 p. Available from: <http://libgen.io/book/bibtex.php?md5=2520791E79D1C7E87C1D80ABEC526B6B>