

Penggunaan Darah Kadarluarsa Sebagai Media Isolasi dan Identifikasi *Streptococcus faecalis*

(The Usage of Expired Blood as isolation media and identification of *Streptococcus faecalis*)

Mudatsir

Staf Pengajar pada Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh

Abstract

Efforts to find microbes in microbiological examination of material are carried out by means of isolation and identification of microorganisms from the examination material. Isolation was carried out using culture medium. Use a medium for the isolation and identification are closely related with one of Koch's postulates, that is causing the infection must be cultured in the laboratory. Research on the use of expired blood as a medium of isolation and identification of *Streptococcus pyogenes* has been performed. The aim study is to determine the viability of the colony and the size of the zone of hemolysis of *Streptococcus pyogenes* in the blood as a medium expired. Materials use is expired blood 1, 2, 3 and 4 weeks. Isolation procedures and identification of *Streptococcus pyogenes* include Gram stain, type of hemolysis, catalase test, and test basitrasin. The results showed the blood expired before four weeks show the number of colonies was almost the same viability with sheep blood agar medium and large blood hemolysis zone are also nearly equal to expire so that the blood of sheep prior to 4 weeks. Thus the blood is exceeded before the 4 weeks can be used as media for the isolation and identification of *Streptococcus pyogenes*

Key Words: blood expired, *Streptococcus pyogenes*, hemolysis

PENDAHULUAN

Untuk menemukan mikroba dalam bahan pemeriksaan secara mikrobiologi dilakukan dengan cara mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme dari bahan pemeriksaan. Isolasi mikroba tersebut dilakukan dengan menggunakan medium biakan. Penggunaan medium untuk isolasi dan identifikasi ini berkaitan erat dengan salah satu postulat Koch, yaitu mikroorganisme penyebab infeksi harus dapat diisolasi di laboratorium (Murray dkk, 2007).

Untuk mengisolasi bakteri tertentu memerlukan media yang kompleks atau media yang diperkaya. Hal ini sangat penting karena menumbuhkan bakteri secara optimal dan dapat pula menunjukkan karakteristik koloni yang spesifik pada medium biakan tersebut.

Menurut *American Public Health Association* (APHA) bahwa penambahan darah atau serum ke dalam medium menyebabkan medium kaya akan nutrisi yang dibutuhkan mikroba, salah satunya adalah menumbuhkan kuman-kuman patogen 'fastidious' (Neema dkk, 2008). Pada

mulanya untuk memperkaya medium digunakan darah kuda, tetapi karena darah kuda banyak mengandung faktor V (piridin nukleotida) maka darah ini lebih baik untuk pertumbuhan *Haemophilus haemolyticus*, sedangkan untuk pertumbuhan kuman lainnya, seperti *Streptococcus* lebih baik menggunakan darah domba, terutama untuk mengamati adanya hemolisis (Facklam dan Washington, 1991 dan Ellen dkk, 2009).

Sebenarnya penggunaan darah dalam medium lebih baik menggunakan darah manusia, karena darah manusia kaya akan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri. Di samping itu, manusia merupakan hospes bagi bakteri patogen untuk menimbulkan infeksi (Shulman dkk., 1994; Mudatsir dkk., 1999). Tetapi penggunaan darah manusia untuk pembuatan medium agar darah menemui beberapa kendala, seperti sulit mendapatkan darah donor karena lebih diutamakan untuk kepentingan kemanusiaan, oleh karena itu darah domba masih tetap dipertahankan penggunaannya untuk medium biakan.

Untuk mendapatkan darah domba diperlukan pengadaan domba sendiri dan sarana pemeliharaan, hal ini merupakan masalah tersendiri bagi beberapa

laboratorium. Di samping itu saat ini telah ada darah domba yang difibrinasi dijual secara komersial dipasaran umum namun harganya masih sangat mahal (Andrew dkk, 2007). Pada sisi lain darah kadaluarsa pengadaannya lebih praktis dan murah, karena darah kadaluarsa selalu tersedia di bank-bank darah Palang Merah Indonesia (PMI) setempat.

Pada bank darah, darah donor biasanya ditampung dalam kantong plastik dengan teknik aseptik. Antikoagulan yang biasa diberikan adalah *citrate-fosfat dekstose* (CPD). Bila waktu penyimpanannya terlewat, maka darah menjadi kadaluarsa, darah sering terbuang percuma. Hal ini disebabkan darah tersebut tidak mungkin lagi ditransfusikan ke resipien karena beberapa faktor antara lain rendahnya daya hidup eritrosit dan terjadinya perubahan transportasi oksigen serta telah sangat berkurangnya faktor pembekuan, yaitu faktor V dan faktor VIII (Wintobe dkk., 1991).

Isolasi *Streptococcus beta-haemolyticus* (*Streptococcus pyogenes*) harus dipakai medium yang mengandung darah atau serum. Pada pembenihan biasa, pertumbuhannya kurang subur jika medium dasar tidak diperkaya (Warsa, 1993). Setelah diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37⁰C, kuman ini akan menyebabkan lisis sempurna pada medium agar darah, sehingga akan terlihat zona bening di sekitar koloni kuman beberapa kali diameter koloni kuman (Willet, 1992 dan Russel dkk, 2006))

Streptococcus berdasarkan karakteristik pertumbuhannya pada medium agar darah memperlihatkan berbagai tipe hemolisis, yaitu hemolisis alfa, beta, dan gamma, Darah homba dan darah manusia mempunyai komposisi yang hampir sama. Darah kadaluarsa masih memperlihatkan warna seperti darah segar diharapkan dapat dijadikan alternatif untuk pembuatan agar darah bila pengadaan darah domba tidak tersedia atau sulit pengadaannya.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui viabilitas koloni dan besarnya zona hemolisis darah kadaluarsa sebagai medium pembiakan bakteri *Streptococcus pyogenes*

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan masukan tentang darah kadaluarsa dapat digunakan dan

dimanfaatkan untuk pembuatan medium agar darah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes*.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan penelitian adalah *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari hasil isolasi usap tenggorok penderita tersangka faringitis pada Puskesmas Darussalam Jln. Inong Balee Darussalam Banda Aceh. Selanjutnya bahan pemeriksaan diperiksa di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unsyiah. Darah kadaluarsa untuk pembuatan medium agar darah sebanyak 1 ampul (500 cc) diperoleh dari PMI Cabang Banda Aceh.

Teknik dan Prosedur Penelitian

Bahan pemeriksaan diambil dari ternggorokan dengan usap kapas steril dengan cara, lidah dijulurkan dan ditekan dengan spatel. Usapkan kapas steril pada tonsil dan bagian belakang faring, hindarkan sentuhan pada lidah dan gigi.

Bahan pemeriksaan selanjutnya ditanam pada medium agar darah domba dengan cara goresan (*treaking*), selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

Prosedur Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

Setelah bakteri tumbuh pada media kemudian diidentifikasi. Prosedur identifikasi *Streptococcus pyogenes* adalah pewarnaan Gram, tipe hemolisis, uji katalase, dan basitrasin (Mc Faddin, 1980; Treagen dan Pulliam, 1982; Holt *et al*, 1994).

Pewarnaan Gram

Pertama-tama dibuat sediaan oles dan selanjutnya pada sediaan oles diruangi zat warna Kristal violet selama 1 menit. Selanjutnya zat warna tersebut dibuang/cuci, kemudian ditetesi larutan lugol dan dibiarkan selama 1 menit. Lugol dibuang dan dibilas dengan air, setelah itu sediaan ditetesi alkohol 96% dan dibiarkan selama 6-10 detik. Sediaan dicuci dengan air, kemudian ditetesi larutan safranin dan dibiarkan selama 1 menit. Sediaan dicuci dengan air, lalu dikeringkan, dan terakhir diperiksa dengan mikroskop dengan menggunakan minyak emersi dengan pembesaran 1000 kali.

Tipe Hemolisis

Bahan pemeriksaan yang telah diisolasi dan diidentifikasi ditanam pada medium agar darah domba, kemudian diinkubasikan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diamati adanya tipe hemolisis pada masing-masing koloni yang tumbuh. Tipe hemolisis beta ditandai dengan terbentuknya daerah zone hemolisis (daerah bening) di sekitar koloni kuman dengan diameter 2 – 4 kali diameter koloni kuman. Parameter penentuan zone hemolisis adalah dengan cara mengukur daerah bening sekitar koloni kuman dengan menggunakan mistar (mm) (Washington, 1991; Almurdi, 1996).

Uji Basitrasin

Kuman yang telah dilakukan pewarnaan Gram, tipe hemolisis, dan uji katalase selanjutnya dibuat suspensi dengan kekeruhan McFarlan 0,5%. Kemudian dilakukan penanaman pada medium agar darah dengan kapas lidi steril secara merata pada permukaan medium. Selanjutnya dengan menggunakan pinset steril dilakukan peletakan cakram kertas yang mengandung Basitrasin 0,05 unit pada permukaan medium perbenihan. Kemudian dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah diinkubasi selama 1 hari diamati daerah zona hambat basitrasin terhadap pertumbuhan kuman.

Pembuatan Medium Agar Darah

Darah kadaluarsa yang diperoleh dari PMI dibawa ke laboratorium untuk pembuatan medium agar darah. Pembuatan medium agar darah dilakukan dengan cara menimbang 40 gram *Blood Agar Base* (Oxoid). Selanjutnya ditambahkan aquades hingga 1000 ml, setelah itu medium dasar tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Pembuatan medium agar darah kadaluarsa dilakukan sebanyak empat kali yaitu 1 minggu setelah kadaluarsa, kemudian darah tersebut disimpan lagi dalam kulkas hingga darah tersebut sudah kadaluarsa 2 minggu, begitu juga untuk pembuatan agar darah kadaluarsa 3 dan 4 minggu.

Darah yang akan digunakan sebelumnya, dilakukan defibrinasi, selanjutnya ditambahkan ke dalam medium dasar tadi. Penambahan darah tersebut dilakukan kira-kira pada suhu 45 – 60 °C sebanyak 5% dari total medium dasar (*Blood Agar Base*) kemudian dikocok sampai homogen. Hal yang sama dilakukan untuk

pembuatan agar darah kadaluarsa 2, 3 dan 4 minggu kemudian medium dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 10-15 ml ke dalam petridis steril (Nash dan Kres, 1991; Atlas, 1993).

Inokulasi Kuman pada Medium Agar Darah

Beberapa koloni kuman dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis, kemudian dibuat suspensi kuman dibandingkan dengan kekeruhan Brown III. Satu ml suspensi kuman yang sama dengan larutan Brown III tersebut dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl fisiologis sehingga didapatkan pengenceran 10⁻¹. pengenceran dilanjutkan sampai 10⁻⁴. pengenceran 10⁻⁴ ini dipakai untuk diinokulasikan pada masing-masing media dengan menggunakan ose steril yang ditanam dengan cara goresan pada masing-masing media, yaitu :

Media A: medium agar darah domba

Media B: medium agar darah kadaluarsa 1 minggu

Media C: medium agar darah kadaluarsa 2 minggu

Media D: medium agar darah kadaluarsa 3 minggu

Media E: medium agar darah kadaluarsa 4 minggu

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes*

Data mengenai viabilitas koloni *Streptococcus pyogenes* pada masing-masing darah kadaluarsa dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* pada masing-masing media darah kadaluarsa

No	Media Darah	Jumlah koloni (CFU)
1	A	70
2	B	67
3	C	65
4	D	60
5	E	58

Bila dilihat tabel 1, ternyata pada media agar darah domba (A) memberikan jumlah koloni tertinggi yaitu 70 diikuti medium agar darah 2 minggu, 3, dan 4 minggu berturut-turut 67, 65, 60 dan 58 CFU

Tingginya jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media agar darah domba mungkin disebabkan karena darah yang digunakan masih dalam keadaan segar, sehingga komponen-komponen darah masih dalam keadaan utuh, seperti haemoglobin dan eritrosit belum mati. Menurut Ellen dkk (2009), darah domba yang di defrinasi adalah bahan yang terbaik untuk pembuatan medium agar darah dan akan memberi zone hemolisis yang sempurna.

Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda seperti yang pernah dilakukan oleh Almurdi (1996) bahwa koloni kuman pada medium agar darah kadaluarsa berkisar 67 koloni pada medium agar darah kadaluarsa 1 minggu dan 68,3 kadaluarsa 2 minggu dan 66 koloni pada agar darah kadaluarsa 3 minggu. Pada penelitian ini ternyata darah kadaluarsa 4 minggu masih menunjukkan pertumbuhan koloni yang baik yaitu 58 koloni/CFU.

Rendahnya koloni kuman pada medium agar darah kadaluarsa dibandingkan dengan medium agar darah domba mungkin karena penggunaan preservasi pada darah kadaluarsa. Menurut Mudatsir dkk (1999) dan Russel dkk (2006) penggunaan sitrat pada darah simpan yang digunakan untuk pembuatan medium agar darah dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis kuman.

Selain itu darah kadaluarsa telah mengalami masa simpan yang cukup lama, Menurut Haenan dkk (1980), pada darah simpan kadar ATP akan menurun dengan perlahan-lahan, sehingga persediaan energinya main berkurang. Hal ini akan menyebabkan pompa K – Na tidak berfungsi dan K akan bocor dari eritrosit sehingga menyebabkan lisis. Dengan lisisnya sebagian eritrosit menyebabkan hemoglobin ke luar dari sel, dan ini akan menyebabkan sumber nutrisi bagi pertumbuhan kuman akan berkurang, karena lisisnya eritrosit.

Jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada keempat media kadaluarsa tidak berbeda, mungkin disebabkan karena darah kadaluarsa yang digunakan masih mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan yang cukup untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan kuman. Menurut Betler dan Srivastava (1980) dan Hall (2006) eritrosit mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan yang sangat kompleks bagi kuman-kuman “fastidius” yaitu sekitar 27 macam asam amino, berbagai vitamin antara lain: tiamin, riboflavin, peridoksin,

nikotinamid, asam pentotenat, dan vitamin C, serta berbagai nukleotida.

Menurut Suharto dan Chatim (1993) untuk pertumbuhan kuman pada medium biakan adalah harus tersedianya sumber nutrisi yang sesuai dan adanya kondisi lingkungan yang optimum. Selanjutnya Wilkinson (1992) menyatakan, nutrisi bakteri yang dimetabolisme dapat berasal dari substrak anorganik dan bahan organik yang kompleks, seperti sumber karbon, energi, dan sumber nitrogen. Di samping itu bakteri itu membutuhkan air dan berbagai elemen tertentu seperti fosfor, sulfur, natrium, kalium, magnesium, dan garam.

2. Besar Zona Hemolisis

Data mengenai besarnya zone hemolisis *Streptococcus pyogenes* pada masing-masing darah kadaluarsa dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini

Tabel 2. Besar zona hemolisis (mm) *Streptococcus pyogenes* pada masing-masing media darah kadaluarsa

No	Media Darah	Ukuran Zona Hemolisis (mm)
1.	A	1,76
2.	B	1,57
3.	C	1,55
4.	D	1,51
5	E	1,50

Keterangan :

A = media agar darah domba

B = media agar darah kadaluarsa 1 minggu

C = media agar darah kadaluarsa 2 minggu

D = media agar darah kadaluarsa 3 minggu

E = media agar darah kadaluarsa 4 minggu

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa tidak tampak adanya perbedaan mencolok besarnya zona hemolisis *Streptococcus pyogenes* pada keempat perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa keempat media memiliki kemampuan yang hampir sama membentuk zona hemolisis oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*

Hasil penelitian ini tidak begitu berbeda seperti yang didapatkan oleh Almurdi (1996) di Bandung, bahwa zone hemolisis kuman paling baik pada darah domba dan pada agar darah kadaluarsa 3 minggu dalam 1,57 mm. Pada penelitian ini zone hemolisis pada medium agar darah kadaluars antara 1,57 – 1,51 mm. Pada penelitian ini menunjukkan juga bahwa darah kadaluarsa setelah 4 minggu masih menunjukkan zone hemolisis 1,50 mm.

Terbentuknya zona hemolisis pada permukaan medium agar darah oleh *Streptococcus pyogenes* karena kuman ini menghasilkan hemolisin, suatu produk ekstraseluler yang dapat melisis sel darah merah. Menurut Ross (1992) kuman *Streptococcus pyogenes* Golongan A menghasilkan suatu produk ekstraseluler yaitu streptolisin S dan streptolisin O yang mengakibatkan lisis sel eritrosit. Streptolisin S adalah toksin stabil oksigen yang terdiri dari polipeptida yang menyebabkan hemolisis pada permukaan medium agar darah pada keadaan aerob.

Bila diamati ukuran koloni *Streptococcus pyogenes* adalah 0,5 mm, sedangkan zone hemolisis yang terbentuk berkisar 1,5 – 2,0 mm. Adanya zona hemolisis dengan ukuran beberapa kali diameter koloni kuman merupakan ciri spesifik *S. Betahaemolitycus* (Hall dkk, 2006). Menurut Moffet (1994) untuk membedakan *Streptococcus* yang hemolitik dengan kuman-kuman hemolitik lainnya seperti *Staphylococcus* adalah dengan memperhatikan besarnya zona hemolisis yang dibentuk. Pada *Staphylococcus* zona hemolisis lebih kecil dibandingkan besar koloni kuman, sedangkan pada *Streptococcus pyogenes* ukuran zona hemolisis besarnya beberapa kali diameter koloni kuman (Hall dkk, 2006).

Reaksi hemolisis sangat bermanfaat untuk membedakan jenis-jenis tertentu *Streptococcus*. Adanya reaksi hemolisis dalam medium biakan, serta dibantu data klinis sangat membantu klinisi dalam menegakkan diagnosis penyakit infeksi khususnya oleh *S. Betahaemolitycus* (Moffet, 1994 dan Mudatsir dkk., 1999).

SIMPULAN

1. Medium agar darah kadaluarsa sebelum empat minggu memperlihatkan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang sama dengan medium agar darah domba
2. Medium agar darah kadaluarsa sebelum empat minggu memperlihatkan zone hamolisis dan reaksi hemolisis yang sama dengan medium agar darah domba.

DAFTAR PUSTAKA

Adlas, RM. 1993. *Handbook of Microbiological Media*. London CR Press 533-542.

Almurdi, 1996. *Penggunaan Darah Kadaluarsa Sebagai Medium Biakan Streptococcus*. Universitas Padjajaran. Bandung. 36-47.

Andrew L, Stanley M, Reller, LB and Melvin P. W. 2007. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? *J. Clin. Microbiol.* 45:3546-3548

Beutler, E. dan SK. Srivastava., 1980. Composition of The Erythrocyte. In: Wiliam, J.E; Beutler, E. *Hematology*. Second Edition. McGraw-Hill Book Company. USA. 135-139.

Ellen Yeh, Benjamin A. Pinsky¹, Niaz Banaei, Ellen Jo Baron. 2009. Hair Sheep Blood, Citrated or Defibrinated, Fulfills All Requirements of Blood Agar for Diagnostic Microbiology Laboratory Tests. *PLoS ONE*. 4: 1-8

Faclam, R.R dan J.A. Washington., 1991. Streptococcus Related Catalase-Negative Gram Positive Cocci. In: Ballow, A; Hause, W; Herman K. dkk. *Clinical Microbiology*. 5th Edition. American Society Microbiology. Washington DC. 238-256.

Hall, KK and Lyman JA. 2006. Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clin Microbiol Rev.* 19: 788–802.

Holt. J.G; NR. Krieng; P.A Sneath; J.T Staley, dan S.T William. 1994. *Bergery's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. William & Wilkins. Baltimore. 532-555.

Lay. B.W. 1994. *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. PT. Gramedia. Jakarta 31-42.

Levinson, W.E. dan E. Jawetz., 1994. *Medical Microbiology & Immunology*. Third Editon. Printice Hall International. USA. 70-75.

- Mc.Faddin, J.P. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Second Edition. Williams & Wilkins. London. 164-176
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA .2007. *Manual of Clinical Microbiology* 9th edition. Washington DC: American Society of Microbiology Press. pp 2256.
- Mudatsir; Zulfitri; dan Husna. 1999. *Penggunaan Beberapa Medium untuk Isolasi dan Identifikasi Enterococcus faecalis dan Pola Kepekaannya Terhadap Beberapa Antibiotik*. Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Nasp. P dan M.M Krenz., 1991. Culture Media in ; Ballow A; E. Hasue; K.Herrman. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th Edition. American Society Microbiology. Washington DC. 1226-1231.
- Neema M, Stephen B Gordon, Temwa Kusimbwe, Eduard E Zijlstra, Malcolm E Molyneux and Neil French. 2008. Blood culture collection technique and pneumococcal surveillance in Malawi during the four year period 2003–2006: an observational study. *BMC Infect. Diseases*.8:1-6
- Power, D.A dan P.J Mc Ciem., 1988. *Manual of BBL Product and Laboratory Procedures* Sixth Edition USA. 94-116.
- Russell, FN, S. S. N. Biribo,G. Selvaraj, F. Oppedisano , S. Warren, A. Seduadua, E. K. Mulholland and J. R. Carapetis. 2006. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3346-3351.
- Shulman, ST; J,P Phair; H.M Sommers., 1994. *Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi*. Edisi Keempat. Penerjemah; Wahab, AS. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 106-121.
- Suharto dan A. Chatim., 1993. Fisiologi Pertumbuhan Kuman. Dalam : *Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta. 18-22.
- Treagen, L dan L. Pulliam., 1982. *Medical Microbiology Laboratory Procedures*. WB Saunders Company. Philadelphia. 14-21.
- Warsa, UC. 1993. Kokus Positif Gram. Dalam; *Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. 112-122.
- Wilkinson,JF. 1992. Growth and Nutrition of Microorganisms. In: Greenwood, D; RCB. Slank; J.P Peuthere, JP. *Medical Microbiology*. Churchill Livingstone. Hongkong/ 31-42.
- Willett, HP. 1992. Streptococcus. In *Zinsser Microbiology*. 20th Edition. Apleton & Lange California. 417-431
- Wintrobe, MM; GR. Lee; DR. Boggs; R. Bitchell; J.W Foerster. 1991 *Clinical Hematology*. Eight. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia. 88-104.