



**MODUL BIOMEDIK 1
(KES 504)**

**MODUL SESI KE-8
PEMERIKSAAN MIKROBA DI LABORATORIUM**

**DISUSUN OLEH
Dr. Henny Saraswati, S.Si, M.Biomed**

**UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2021**

PEMERIKSAAN MIKROBA DI LABORATORIUM

A. Kemampuan Akhir Yang Diharapkan

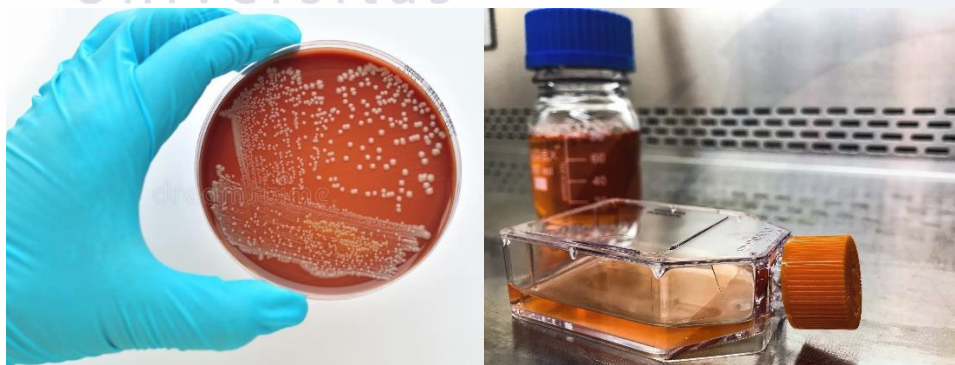
Setelah mempelajari modul ini, diharapkan mahasiswa mampu :

1. Mengetahui cara pengambilan specimen/sampel dari pasien atau lingkungan.
2. Menjelaskan cara pemeriksaan mikroba di laboratorium.
3. Memahami jenis pengujian biokimia untuk mikroba.
4. Mengetahui cara inokulasi bakteri pada media kultur.

B. Uraian dan Contoh

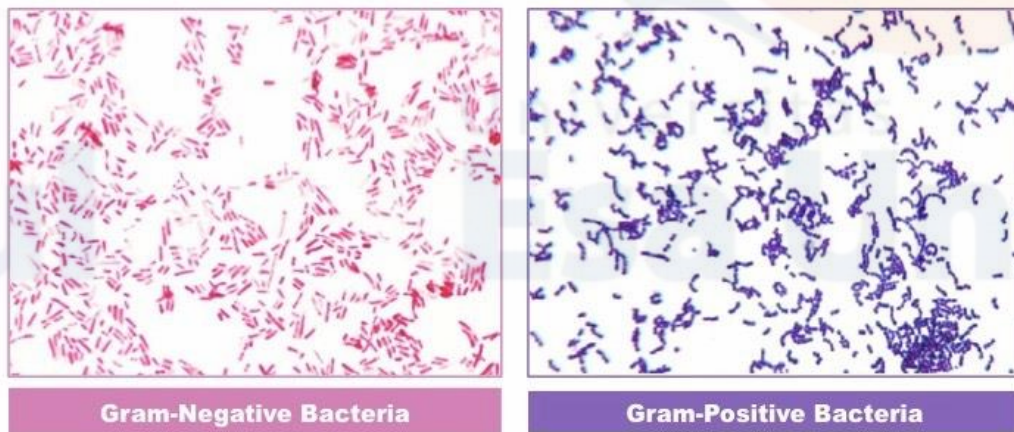
Pemeriksaan ada tidaknya mikroba di suatu sampel dilakukan di laboratorium. Pemeriksaan ini memiliki beberapa tujuan, diantaranya untuk diagnosis penyakit. Artinya, untuk mengetahui penyakit dan mikroba penyebabnya. Untuk diagnosis penyakit, pemeriksaan mikroba bisa dilakukan dengan beberapa metode, antara lain **kultur mikroba, pewarnaan gram, tes serologi dan pemeriksaan molekuler.**

Kultur mikroba artinya dilakukan penanaman/kultur mikroba. Tujuannya adalah untuk perbanyak mikroba. Sehingga, mikroba ini dapat diidentifikasi nama spesiesnya.



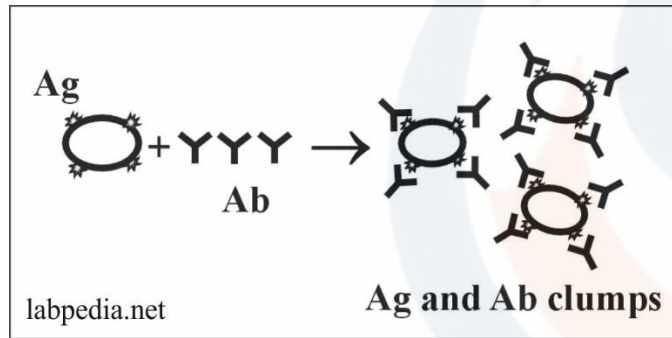
Gambar 1. Kultur bakteri (kiri) dan kultur virus (kanan) dapat digunakan untuk identifikasi jenis mikroba.

Pada pemeriksaan bakteri, penting juga dilakukan **pewarnaan gram** untuk mengetahui jenis gramnya. Hal ini penting dalam diagnosis serta dalam tindakan pengobatan penyakit tersebut. Penampakan warna antara bakteri gram negatif akan berbeda dengan bakteri gram positif, setelah diwarnai. Mengapa bisa demikian? Coba kalian buka kembali pembahasan mengenai struktur dinding sel bakteri. Kemudian jelaskan hubungannya dengan pewarnaan gram.



Gambar 2. Hasil pewarnaan gram pada bakteri gram negatif (kiri) dan gram positif (kanan). Bakteri gram negatif akan terwarnai merah muda sedangkan gram positif akan terwarnai biru keunguan.

Pemeriksaan serologi juga dapat digunakan dalam pemeriksaan mikroba untuk mengetahui titer antibodi terhadap mikroba atau titer antigen dari mikroba itu sendiri. Pemeriksaan ini dilakukan dengan sampel darah. Prinsip pemeriksaan serologi ini adalah adanya ikatan antara antigen dengan antibodi. Jika kita ingin mengetahui antibodi terhadap mikroba tertentu, maka kita dapat mereaksikannya dengan antigen, sehingga terjadi perubahan warna. Jika tidak terjadi perubahan warna, maka diartikan tidak ada antibodi yang dimaksud. Demikian juga sebaliknya, jika kita ingin mengetahui ada tidaknya antigen mikroba tertentu dalam darah pasien, maka dapat kita reaksikan dengan antibodi. Jika positif (terdapat antibodi) maka bisa terjadi perubahan warna larutan.



Gambar 3. Prinsip uji serologi adalah adanya ikatan antara antigen (Ag) dengan antibodi (Ab).



Gambar 4. Uji serologi dilakukan dengan menggunakan darah pasien. Dalam gambar ini diperlihatkan salah satu metode uji serologi cepat untuk diagnosis penyakit.

Saat ini **pemeriksaan molekuler** untuk mikroba menjadi metode pemeriksaan yang sering digunakan untuk diagnosis penyakit. Pemeriksaan ini menggunakan material genetik dari mikroba, yaitu DNA atau RNA. Metode ini dikenal lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan metode lain, sehingga menjadi metode yang berkembang. Akan kita bahas mengenai pemeriksaan molekuler ini pada akhir modul ini.

Pengambilan sampel.

Dalam pemeriksaan mikroba di laboratorium, perlu diperhatikan mengenai pengambilan sampel. Terhadap hal-hal yang harus diberikan perhatian lebih, antara lain :

- Pengambilan spesimen harus mengikuti standar SOP yang benar
- Kondisi penyimpanan sampel steril.
- Kondisi pengiriman sampel ke laboratorium, apakah memerlukan suhu dingin atau tidak.
- Waktu pengambilan sampel, apakah lebih baik diambil pada waktu-waktu tertentu seperti pagi hari, sebelum tidur dan lain-lain.
- Lokasi/daerah pengambilan.
- Jumlah sampling, apakah perlu dilakukan pengambilan berulang atau tidak.

Setelah sampel didapatkan maka sesegera mungkin dibawa ke laboratorium untuk diperiksa. Hal ini dilakukan untuk mencegah kerusakan sampel yang berakibat pada kerusakan mikroba sehingga tidak dapat diperiksa kembali. Juga untuk menghindari multiplikasi mikroba yang berlebihan, yang dapat mengganggu proses identifikasi mikroba.



Gambar 5. Sampel harus sesegera mungkin dibawa ke laboratorium. Jika berjarak jauh dan memerlukan wadah transport, maka harus aman, mencegah sampel tumpah dan jika diperlukan bisa menggunakan es untuk menjaga kondisi dingin.

Sumber sampel.

Sapel dari pasien bisa didapatkan dari beberapa sumber, antara lain dari urin, feses, darah, saluran nafas dan lain-lain. Sedangkan untuk sampel dari lingkungan bisa berasal dari tanah, air ataupun bagian tumbuhan. Sumber yang bermacam-macam ini tergantung dari tujuan pemeriksaan mikroba yang akan dilakukan.



Gambar 6. Urin, darah maupun saluran nafas bisa menjadi sumber sampel dari pasien untuk pemeriksaan mikroba di laboratorium.

Di dalam pengambilan sampel ini, terdapat beberapa teknik yang dapat dilakukan, yang disesuaikan dengan sumber sampel dan juga tujuan pemeriksaan. Cara-cara pengambilan sampel pada pasien antara lain :

- a. Swab (usapan).
- b. Pembilasan.
- c. Pengambilan cairan tubuh.

Pada metode pengambilan sampel dengan **swab**, maka yang dilakukan adalah mengusap bagian yang dicurigai mengandung banyak mikroba dengan kapas swab. Diharapkan, mikroba akan terambil dengan kapas swab tersebut. Setelah itu sampel dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Untuk mencegah terjadinya banyak kematian mikroba dalam transport ke laboratorium, maka alat swab umumnya juga dilengkapi dengan tabung yang berisi media transport. Kapas swab dapat dimasukkan ke dalam tabung tersebut.



Gambar 7. Kapas swab dapat digunakan untuk pengambilan sampel dengan cara usapan. Setelah didapatkan sampelnya, kapas swab kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi media transport untuk melarutkan mikroba dan juga menjaga mikroba tetap hidup.

Pengambilan sampel dengan **pembilasan** dilakukan dengan cara melarutkan mikroba pada daerah tertentu dengan cairan. Hal ini dilakukan apabila pengambilan sampel dengan cara lain susah untuk dilakukan. Misalnya, prosedur bilas lambung pada anak-anak untuk diagnosis tuberkulosis. Hal ini dilakukan karena pengambilan dahak dari anak-anak umumnya sukar dilakukan.

Cairan tubuh juga dapat digunakan sampel. Semisal urin, darah, nanah dari luka dan lain-lain. Untuk pengambilan urin bisa dilakukan dengan metode urin porsi tengah atau pengambilan 24 jam. Sampel urin porsi tengah dilakukan dengan cara pasien membuang pancaran urin pertama ketika berkemih, kemudian pancaran urin setelahnya baru ditampung di wadah steril untuk dibawa ke laboratorium. Sedangkan pengambilan urin 24 jam dilakukan pengambilan urin setiap kali pasien berkemih selama 24 jam. Untuk pengambilan sampel darah dilakukan dengan menggunakan jarum dan ditampung pada tabung antikoagulan. Tabung ini mengandung antikoagulan yang dapat mencegah pembekuan darah. Sehingga darah dapat digunakan dalam pemeriksaan di laboratorium.

Untuk pengambilan sampel dari lingkungan dilakukan dengan menggunakan wadah yang steril dan pada lokasi tertentu. Semisal mengambil sampel dari tanah, bisa dilakukan di beberapa lapisan tanah, terutama di bagian rizosfer yang banyak mengandung mikroba.

Penyimpanan dan Pengiriman Sampel.

Setelah sampel bisa didapatkan, maka hal lain yang harus diperhatikan adalah proses pengiriman dan penyimpanan sampel. Hal-hal yang harus diperhatikan antara lain adalah wadah yang digunakan, jangka waktu yang diperlukan, suhu yang digunakan serta ada tidaknya media transport.

Wadah yang digunakan dalam pengambilan, pengiriman maupun penyimpanan sampel haruslah wadah yang steril dan memang diperuntukkan untuk sampel yang digunakan. Hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi dari mikroba-mikroba lain terhadap sampel kita. Selain itu, wadah juga harus dalam keadaan tertutup. Beberapa sampel memerlukan wadah khusus seperti darah, yang memerlukan tabung antikoagulan.

Setelah terambil, sampel juga harus sesegera mungkin dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Jika jarak antara tempat pengambilan sampel dengan laboratorium cukup jauh, maka harus dilakukan beberapa langkah untuk mencegah kerusakan sampel yang berakibat pada kematian mikroba yang akan diperiksa. Hal ini bisa dilakukan dengan cara penggunaan suhu dingin (4°C) dalam pengirimannya, Bisa juga dengan penggunaan medium transport khusus untuk mencegah kerusakan sel mikroba atau sel yang mengandung mikroba. Demikian juga dalam penyimpanannya, umumnya diperlukan suhu dingin untuk penyimpanan sampel selama beberapa hari.

Sterilisasi Alat dan Bahan.

Selain sampel, hal lain yang harus diperhatikan adalah peralatan dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan mikroba di laboratorium. Alat dan bahan ini harus kita sterilisasi untuk mencegah kontaminasi mikroba-mikroba lain. Jika terjadi kontaminasi maka dapat mengganggu pemeriksaan mikroba di laboratorium.

Sterilisasi adalah usaha untuk mematikan segala jenis mikroba pada peralatan dan bahan yang digunakan. Sterilisasi ini dapat mematikan bakteri, virus maupun spora. Beberapa metode sterilisasi dapat dilakukan, seperti dengan panas, bahan kimia, radiasi dan dengan filtrasi. Kita akan membahasnya satu persatu.



Gambar 8. Contoh kontaminasi jamur pada media pertumbuhan bakteri.

Sterilisasi panas bisa dilakukan dengan menggunakan **uap panas** dan **pembakaran**. Sterilisasi dengan **uap panas** menggunakan alat yang disebut dengan *autoclave*. Alat ini mirip cara kerjanya dengan panci presto yang sering digunakan dalam memasak. Sterilisasi dengan *autoclave* dilakukan dengan menggunakan suhu yang sangat tinggi berasal dari uap panas yang dihasilkan. Suhunya mencapai 121°C . Selain bersuhu tinggi alat ini juga menghasilkan tekanan udara yang tinggi. Jadi sterilisasi dengan autoclave menggunakan 2 hal, yaitu suhu tinggi dan tekanan tinggi. Sterilisasi dengan alat ini dilakukan selama 30 menit.



Gambar 9. Mesin autoclave untuk sterilisasi alat dan bahan dengan suhu dan tekanan tinggi.



Gambar 10. Media kultur (kiri) dan peralatan (kanan) bisa disterilisasi di autoclave.

Untuk peralatan dibungkus dulu dengan pembungkus kemudian disterilisasi.

Sterilisasi dengan pembakaran bisa dilakukan dengan membakar langsung peralatan yang digunakan menggunakan api. Contohnya adalah pembakaran jarum inokulasi yang akan digunakan dalam penanaman/inokulasi bakteri ke media. Caranya adalah membakar ujung jarum inokulasi pada api/Bunsen hingga berpijar, kemudian diamkan sebentar hingga agak dingin, baru digunakan untuk menanam bakteri.



Gambar 11. Jarum inokulasi dibakar pada api (Bunsen) untuk sterilisasi (kiri) sebelum digunakan dalam proses penanaman bakteri (kanan).

Sterilisasi dengan **bahan kimia** bisa menggunakan gas, seperti gas etilen oksida dan nitrogen dioksida. Sterilisasi dengan gas ini dapat digunakan untuk peralatan yang bisa rusak jika disterilisasi dengan uap panas atau pembakaran. Namun sterilisasi gas ini lebih mahal dan adanya potensi untuk menyebabkan keracunan pada personil di laboratorium. Selain dengan gas, sterilisasi dengan bahan kimia bisa menggunakan glutaraldehid dan formaldehid. Kelebihan dari penggunaan bahan kimia ini adalah kemampuannya yang sangat

baik untuk membunuh mikroba dan harganya yang tidak mahal. Kekurangannya adalah adanya uap yang berpotensi menimbulkan iritasi pada saluran pernafasan, kulit dan mata jika terkena. Sehingga personil yang menggunakan bahan-bahan kimia ini harus menggunakan alat pelindung diri yang sesuai.



Gambar 12. Beberapa jenis gas dapat digunakan untuk sterilisasi.

Sinar X dan sinar UV juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi. Metode yang digunakan dinamakan metode radiasi. Beberapa keuntungan yang didapat dengan menggunakan teknik radiasi adalah kemampuannya dalam merusak material genetik mikroba, waktu sterilisasi yang pendek, dapat digunakan untuk berbagai bentuk bahan (padat, cair dan gas), tidak menghasilkan residu dan peningkatan suhu. Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah peralatan yang digunakan cukup mahal, tidak dapat digunakan untuk berbagai bahan benda (plastik PVC dan PTFE dapat rusak dengan sterilisasi ini) dan memerlukan penanganan limbah radioaktif.

Satu lagi jenis sterilisasi yang dapat digunakan untuk membunuh mikroba adalah sterilisasi dengan filtrasi. Metode ini merupakan penyaringan larutan menggunakan filter yang memiliki pori-pori yang sangat kecil, sehingga disebut dengan mikrofilter. Bakteri dan virus dapat tersaring dengan mikrofilter ini, sehingga larutan terbebas dari bakteri dan virus, serta dapat digunakan. Penggunaan metode ini sering dilakukan pada larutan yang akan rusak jika dilakukan pemanasan (sterilisasi panas). Contoh larutan ini adalah media pertumbuhan. Dimana di dalam media banyak sekali nutrisi yang akan rusak jika dipanaskan. Ukuran pori dari mikrofilter dapat disesuaikan. Untuk pori-pori berukuran $0,22 \mu\text{m}$ dapat digunakan

untuk menyaring bakteri, sedangkan mikrofilter dengan ukuran pori 0,45 μm dapat digunakan untuk menyaring virus.



Gambar 13. Proses sterilisasi dengan mikrofilter dilakukan untuk menyaring bakteri dan virus.

Inokulasi Bakteri.

Sekarang kita akan memasuki tahapan penanaman mikroba, dalam hal ini adalah bakteri. Untuk penanaman virus perlu pembahasan tersendiri, karena dalam kultur virus diperlukan sel hidup yang perlu metode khusus pula dalam penanamannya. Sedangkan kultur fungi hampir sama dengan kultur bakteri, hanya saja media pertumbuhan, suhu dan lama waktu pertumbuhan yang berbeda.

Terdapat beberapa teknik inokulasi (penanaman) bakteri yang bisa dilakukan. Hal ini terutama dilakukan di media padat. Pemilihan metode penanaman yang digunakan disesuaikan dengan tujuan pemeriksaan. Metode inokulasi bakteri antara lain :

- a. Metode gores (*streak plate*).
- b. Metode tebar (*spread plate*).
- c. Metode tuang (*pour plate*).
- d. Metode tusuk (*stabbing method*).

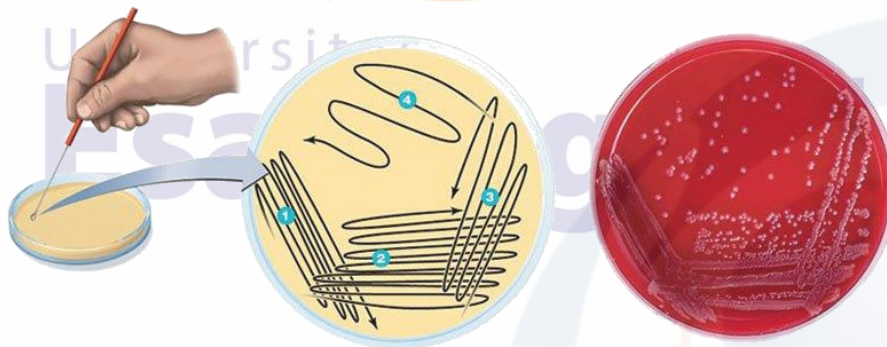
Metode gores merupakan metode yang paling sering digunakan dalam inokulasi bakteri. Cara inokulasinya adalah dengan menggoreskan bakteri (inokulum) ke media agar. Alat bantu yang digunakan adalah jarum inokulasi, baik yang ujungnya tajam atau yang bulat. Bakteri yang ada di ujung jarum inokulasi ini digoreskan ke media agar.



Gambar 14. Bentuk jarum inokulasi untuk menanam bakteri, ada yang berujung bulat dan ada yang runcing.

Teknik goresan untuk *streak plate* ini juga tidak asal digoreskan. Tetapi perlahan-lahan membentuk struktur zig zag, kemudian berpindah ke sisi yang lain dan demikian seterusnya hingga nanti saat bakteri tumbuh akan membentuk koloni tunggal.

Streak Plate Method



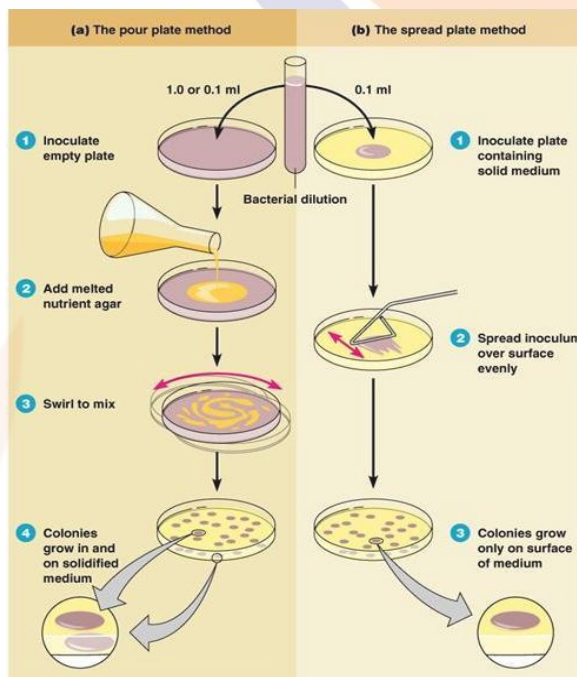
Gambar 15. Metode gores (*streak plate*) dilakukan dengan menggoreskan jarum inokulasi pada kuadran 1, kemudian dilanjutkan ke kuadran 2 dan seterusnya hingga kuadran 4. Teknik ini dapat menghasilkan koloni tunggal (gambar kanan) yang sangat baik untuk pemeriksaan mikroba (sumber: www.microbenotes.com).

Berbeda dengan metode gores, pada **metode tebar**, bakteri yang berasal dari media cair ditetaskan (1 tetes) pada media padat. Setelah itu diratakan dengan alat *spreader*.



Gambar 16. Berbagai bentuk spreader yang dapat digunakan untuk meratakan bakteri pada metode tebar.

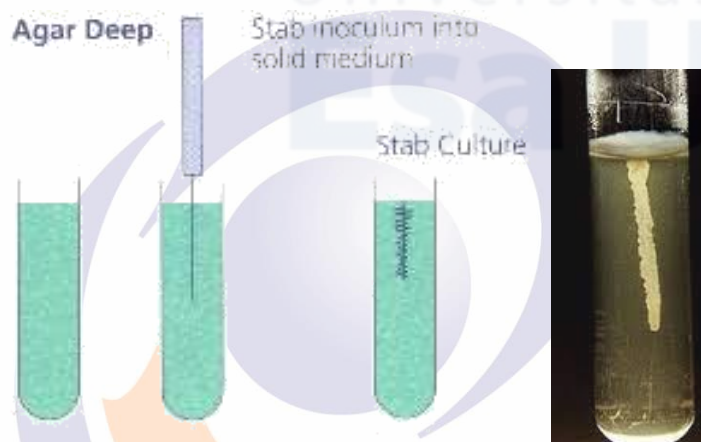
Ada lagi **metode tuang** yang hampir mirip dengan metode tebar, hanya saja pada metode tuang bakteri pada media cair dituang terlebih dahulu pada cawan Petri dengan volume tertentu. Setelah itu, baru dituangkan media padatnya. Sehingga bakteri dapat tumbuh pada bagian dalam dan atas media padat.



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Gambar 17. Perbedaan antara metode tebar dan tuang dalam inokulasi bakteri.

Beberapa bakteri ada yang bersifat anaerobik, artinya tidak memerlukan oksigen dalam pertumbuhannya. Sehingga, dalam proses inokulasinya tidak bisa menggunakan metode gores, tuang maupun tebar. Metode yang bisa dilakukan untuk menumbuhkan bakteri ini adalah **metode tusuk**. Caranya adalah memasukkan inokulum ke dalam media padat menggunakan jarum inokulasi. Jarum yang telah mengandung bakteri di ujungnya ditusukkan ke bagian dalam media padat tegak. Hasilnya adalah bakteri dapat tumbuh di sepanjang bekas tusukan tersebut.



Gambar 18. Metode tusuk dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri anaerob.

Setiap kegiatan penanaman mikroba harus dilakukan secara aseptis. Artinya harus dapat menghindari kontaminasi pada kultur bakteri tersebut. Seperti contohnya kontaminasi. Teknik aseptik yang bisa dilakukan antara lain seperti dengan sterilisasi jarum inokulasi, area kerja untuk penanaman harus bersih, selalu melakukan penanaman bakteri dekat dengan Bunsen (api).



Gambar 19. Contoh teknik aseptik dalam inokulasi bakteri.

Uji-uji Biokimia untuk Mikroba.

Uji-uji biokimia dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tertentu dan dapat menjadi uji pelengkap untuk diagnosis penyakit. Hal ini dikarenakan beberapa bakteri dapat menghasilkan enzim-enzim tertentu yang berbeda satu sama lain.

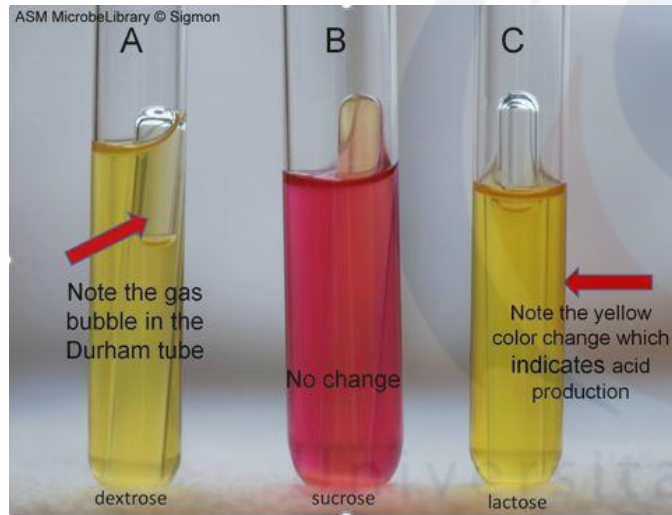
Uji-uji biokimia ini banyak, bisa dipilih pada saat kegiatan pemeriksaan mikroba di laboratorium, antara lain :

- a. Uji katalase.
- b. Uji fermentasi gula-gula.
- c. Uji koagulase.
- d. Uji Oksidase
- e. Uji Indol.
- f. Uji Metil merah .
- g. Uji Voges Proskauer
- h. Dll.

Untuk pembahasan dalam modul ini, hanya 2 uji biokimia yang dipilih. Untuk uji-uji lainnya dapat kalian baca secara lebih detil pada referensi lain.

a. Uji Fermentasi gula-gula.

Beberapa bakteri dapat melakukan fermentasi karbohidrat, sehingga kemampuan ini dimanfaatkan dalam uji pemeriksaan bakteri di laboratorium. Uji fermentasi gula-gula menggunakan media dengan karbohidrat serta penanda pH (indikator pH). Karena proses fermentasi dapat menyebabkan peningkatan kadar keasaman medium. Sehingga indikator pH yang ada pada media menjadi berubah warna. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna dari keunguan menjadi kuning. Selain itu dalam uji ini juga ditambahkan tabung Durham untuk menangkap gas yang dihasilkan dari proses fermentasi.



Gambar 20. Hasil uji fermentasi gula-gula. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari keunguan menjadi kuning. Hasil fermentasi juga dapat menghasilkan gas yang tertangkap dengan tabung Durham.

b. Uji Katalase.

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menghasilkan enzim katalase. Enzim ini dapat memecah Hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.



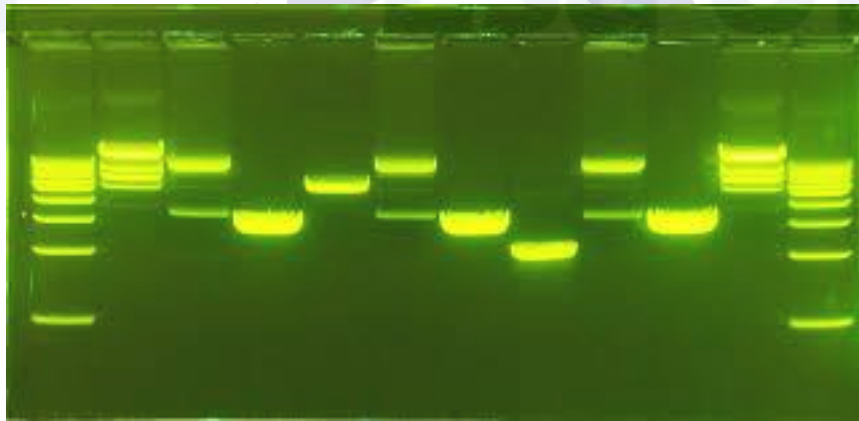
Hasil positif dari uji ini adalah adanya gelembung udara pada media uji. Artinya bakteri tersebut dapat memecah H_2O_2 yang diberikan menjadi air dan oksigen.



Gambar 21. Hasil uji katalase.

Pemeriksaan molekuler.

Pemeriksaan molekuler digunakan untuk mengetahui ada tidaknya mikroba dalam sampel. Berbeda dengan uji yang lain, maka metode ini menggunakan material genetik mikroba, yaitu DNA atau RNA. Prinsip kerja metode ini adalah perbanyak material genetik mikroba. Teknik yang bisa digunakan untuk pemeriksaan ini adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pemeriksaan molekuler ini menjadi salah satu pemeriksaan yang berkembang karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Salah satunya adalah metode real-time PCR (RT-PCR) untuk diagnosis COVID-19. Pada metode ini dilakukan perbanyak RNA dari virus SARS-CoV-2.



Gambar 22. Hasil PCR yang diamati dengan elektroforesis agarosa.

C. Latihan

- Uji molekuler untuk mikroba bisa menggunakan...
- Untuk melihat kemampuan mikroba dalam memecah hidrogen peroksida bisa menggunakan uji...
- Teknik penanaman bakteri yang bisa menghasilkan koloni tunggal adalah

D. Kunci Jawaban

- DNA atau RNA mikroba.
- Katalase.
- Teknik gores (*streak plate*).

E. Daftar Pustaka

1. Willey, J.M, L.M Sherwood, C.J. Woolverton. 2008. Prescott, Harley and Klein's Microbiology. 7th Edition. McGraw Hill Higher Education. Boston.
2. Pommerville, J.C. 2011. Alcamo's Fundamental of Microbiology. 9th edition. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts.



Universitas
Esa Unggul