

MODUL PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI KLINIK

Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi
Laboratorium Medik



Disusun oleh :

Ardy Prian Nirwana, S.Pd.Bio., M.Si.

Dr. Evy Ratnasari Ekawati, S.Si., M.Si.

Tiara Dini Harlita, SST., M.Si.

I Gusti Agung Ayu Satwikha Dewi, S.Tr.Kes., M.Kes

Rochmanah Suhartati, S.Pd., M.Si.

Bastian, S.Si.T., M.Biomed.

Dr. Moh. Fairuz Abadi. S.Si., M.Si.

Reviewer :

Dra. Estu Lestari, MM

**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK
INDONESIA (AIPTLMI)**

2025

MODUL PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI KLINIK

Bagi Mahasiswa
Program Studi Teknologi Laboratorium Medik



Disusun oleh :

Ardy Prian Nirwana, S.Pd.Bio., M.Si.

Dr. Evy Ratnasari Ekawati, S.Si., M.Si.

Tiara Dini Harlita, SST., M.Si.

I Gusti Agung Ayu Satwikha Dewi, S.Tr.Kes., M.Kes

Rochmanah Suhartati, S.Pd., M.Si.

Bastian, S.Si.T., M.Biomed.

Dr. Moh. Fairuz Abadi. S.Si., M.Si.

Reviewer :

Dra. Estu Lestari, MM.

**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK
INDONESIA (AIPTLMI)**

Judul Buku:

MODUL PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI KLINIK

Penulis:

- Ardy Prian Nirwana, S.Pd.Bio., M.Si.
- Dr. Evy Ratnasari Ekawati, S.Si., M.Si.
- Tiara Dini Harlita, SST., M.Si.
- I Gusti Agung Ayu Satwikha Dewi, S.Tr.Kes., M.Kes
- Rochmanah Suhartati, S.Pd., M.Si.
- Bastian, S.Si.T., M.Biomed
- Dr. Moh. Fairuz Abadi. S.Si., M.Si

Reviewer:

Dra. Estu Lestari, MM

PRAKATA

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmatNya sehingga modul ini bisa tersusun dengan baik. Modul ini disusun agar dapat digunakan oleh semua perguruan kesehatan khususnya program studi Teknologi Laboratorium Medis di Indonesia yang memuat teori dan langkah-langkah praktek serta dilengkapi dengan jurnal pelaporan hasil praktek yang terperinci.

Saya selaku ketua AIPTLMI mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada para dosen TLM dan pihak lain yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu yang telah berkontribusi menyusun modul, memberikan masukan, dengan segala daya dan upaya hingga tersusunnya modul praktikum ini.

Saya berharap modul ini dapat membantu mahasiswa dalam memahami mata kuliah praktikum Bakteriologi Klinik, dan sebagai salah satu upaya peningkatan kemampuan serta keterampilan di bidang bakteriologi sebagaimana yang diharapkan oleh kurikulum kesehatan dan tuntutan kebutuhan pelayanan kesehatan khususnya teknologi laboratorium medis. Masukan dan saran dari berbagai pihak yang berkompeten dalam bidang ini sangat diharapkan untuk penyempurnaan penyusunan modul selanjutnya.

Jakarta, Agustus 2025

Ketua Umum AIPTLMI

Prof. Dr. Budi Santosa, M.Si.Med

DAFTAR ISI

PRAKATA	1
DAFTAR ISI	2
DAFTAR TABEL	4
DAFTAR GAMBAR	5
PENDAHULUAN	
KEAMANAN DAN KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI	6
BAB I SOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI KULIT	10
1.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	10
1.2. PENDAHULUAN	10
1.3. PROSEDUR KERJA	11
1.3.1. Tahap Pra Analitik	11
1.3.2. Tahap Analitik	13
1.3.3. Tahap Pasca Analitik	17
1.4. LAPORAN PRAKTIKUM	18
1.5. EVALUASI	21
1.6. RINGKASAN	24
1.7. GLOSARIUM	24
1.8. DAFTAR PUSTAKA	25
BAB II ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI SALURAN	
GASTROINTESTINAL	26
2.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	26
2.2. PENDAHULUAN	26
2.3. PROSEDUR KERJA	27
2.3.1. Tahap Pra Analitik	27
2.3.2. Tahap Analitik	29
2.3.3. Tahap Pasca Analitik	35
2.4. LAPORAN PRAKTIKUM	37
2.5. EVALUASI	41
2.6. RINGKASAN	43
2.7. GLOSARIUM	43
2.8. DAFTAR PUSTAKA	44
BAB III ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI PERNAFASAN	45
3.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	45
3.2. PENDAHULUAN	45
3.3. PROSEDUR KERJA	46
3.3.1. Tahap Pra Analitik	46
3.3.2. Tahap Analitik	48
3.3.3. Tahap Pasca Analitik	55
3.4. LAPORAN PRAKTIKUM	55
3.5. EVALUASI	59
3.6. RINGKASAN	62
3.7. GLOSARIUM	62
3.8. DAFTAR PUSTAKA	63
BAB IV ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI UROGENITAL	64
4.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	64
4.2. PENDAHULUAN	64
4.3. PROSEDUR KERJA	65
4.3.1. Tahap Pra Analitik	65
4.3.2. Tahap Analitik	68
4.3.3. Tahap Pasca Analitik	74
4.4. LAPORAN PRAKTIKUM	77
4.5. EVALUASI	81
4.6. RINGKASAN	83
4.7. GLOSARIUM	83

4.8. DAFTAR PUSTAKA	- 84 -
BAB V ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL	- 85 -
5.1 TUJUAN PEMBELAJARAN	- 85 -
5.2 PENDAHULUAN	- 85 -
5.3 PROSEDUR KERJA	- 86 -
5.3.1 Tahap Pra Analitik	- 86 -
5.3.2. Tahap Analitik	- 89 -
5.3.3. Tahap Pasca Analitik	- 93 -
5.4 LAPORAN PRAKTIKUM	- 97 -
5.5 EVALUASI	- 101 -
5.6 RINGKASAN	- 103 -
5.7 GLOSSARIUM	- 103 -
5.8 DAFTAR PUSTAKA	- 104 -
BAB VI ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI PADA SISTEM SYARAF	105
6.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	105
6.2. PENDAHULUAN	105
6.3. PROSEDUR KERJA	106
6.3.1. Tahap Pra Analitik	106
6.3.2. Tahap Analitik	107
6.7.3. Tahap Pasca Analitik	109
6.4. LAPORAN PRAKTIKUM	110
6.5. EVALUASI	112
6.6. RINGKASAN	116
6.7. GLOSARIUM	116
6.8. DAFTAR PUSTAKA	116
BAB VII ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI GENITALIA	118
7.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	118
7.2. PENDAHULUAN	118
7.3. PROSEDUR KERJA	118
7.3.1. Tahap Pra Analitik	118
7.3.2. Tahap Analitik	119
7.7.3. Tahap Pasca Analitik	119
7.4. LAPORAN PRAKTIKUM	120
7.5. EVALUASI	122
7.6. RINGKASAN	125
7.7. GLOSARIUM	125
7.8. DAFTAR PUSTAKA	126
BAB VIII DIAGNOSTIK MOLEKULER	127
8.1. TUJUAN PEMBELAJARAN	127
8.2. PENDAHULUAN	127
8.3. PROSEDUR KERJA	128
8.3.1. Tahap Pra Analitik	128
8.3.2. Tahap Analitik	129
8.3.3. Tahap Pasca Analitik	130
8.4. LAPORAN PRAKTIKUM	130
8.5. EVALUASI	132
8.6. RINGKASAN	134
8.7. GLOSARIUM	134
8.8. DAFTAR PUSTAKA	134

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Galur Stock Yang Direkomendasikan Untuk Pengendalian Kualitas*	- 14 -
Tabel 2 Kontrol Kualitas Instrumen	- 15 -
Tabel 3 Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Kulit	- 21 -
Tabel 4 Hasil uji biokimia positif bakteri Salmonella sp. dan Shigella sp	- 33 -
Tabel 5 Hasil uji biokimia positif Vibrio sp.	- 34 -
Tabel 6 Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Gastrointestinal	- 41 -
Tabel 7 Karakteristik Uji Bakteri Bakteri Penyebab Infeksi Pernafasan	- 53 -
Tabel 8 Interpretasi Pembacaan Sakala IUATLD	- 55 -
Tabel 9 Rubrik penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Pernafasan	- 60 -
Tabel 10 Karakteristik Koloni pada Media MC	- 70 -
Tabel 11 Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia	- 71 -
Tabel 12 Karakteristik Koloni pada Media Selektif	- 72 -
Tabel 13 Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia	- 73 -
Tabel 14 Standar Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri	- 74 -
Tabel 15 Kendali Mutu Peralatan di Laboratorium	- 75 -
Tabel 16 Uji Media Perbenihan dan Kultur Menggunakan Kontrol CLSI	- 76 -
Tabel 17 Rubrik Penilaian Praktikum Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Urogenital ..	- 81 -
Tabel 18 Karakteristik Koloni pada Media Isolasi	- 91 -
Tabel 19 Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia	- 92 -
Tabel 20 Standar Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri	- 94 -
Tabel 21 Kendali Mutu Peralatan di Laboratorium	- 95 -
Tabel 22 Uji Media Perbenihan dan Kultur Menggunakan Kontrol CLSI	- 96 -
Tabel 23 Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial ...	- 101 -
Tabel 24 Jenis dan kriteria spesimen Bakteri Penyebab Infeksi Pada Sistem Syaraf	-107-
Tabel 25 Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Pada Sistem Syaraf	-113-
Tabel 26 Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Genitalia	-122-
Tabel 27 Rubrik Penilaian Praktikum Topik Diagnostik Molekuler	-133-

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 . Wadah Tinja Steril	- 27 -
Gambar 2 . Teknik Goresan untuk Biakan Murni	- 30 -
Gambar 3 . Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni <i>E. coli</i> Pada Hari Ke 2	- 31 -
Gambar 4 . Karakteristik Bakteri pada Media Salmonella-Shigella Agar	- 32 -
Gambar 5 . Karakteristik Koloni <i>Vibrio</i> spp pada media TCBS	- 32 -
Gambar 6 Inokasi Secara Streak Plate (goresan)	- 50 -
Gambar 7 Teknik inokulasi spesimen urin, (a) pada media BAP;	- 69 -

PENDAHULUAN

KEAMANAN DAN KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

Laboratorium mikrobiologi merupakan sumber bermacam-macam bahan infeksius dan zat-zat yang berbahaya, sehingga seseorang yang bekerja di laboratorium mikrobiologi harus memahami prosedur keamanan dan keselamatan kerja di laboratorium tersebut. Keamanan di laboratorium adalah keamanan dalam penggunaan bahan, zat, dan peralatan yang ada di laboratorium. Keamanan ini diperlukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi objek pengamatan ataupun kemungkinan dapat menginfeksi laboran, serta adanya pencemaran lingkungan akibat pembuangan limbah.

Keamanan dan keselamatan laboratorium adalah bagian penting dalam melaksanakan pemeriksaan di laboratorium, dengan tujuan melindungi petugas laboratorium dan orang di sekitarnya dari risiko terkena gangguan kesehatan yang ditimbulkan dari laboratorium. Aktivitas di laboratorium mikrobiologi terbatas pada pengujian tertentu untuk medium pertumbuhan mikroorganisme atau agens yang diketahui tidak menyebabkan bahaya potensial bagi pekerja di laboratorium dan lingkungannya, namun memiliki bahaya paparan terhadap agens infeksius atau bahaya biologis.

A. Tujuan

Tujuan memahami konsep dasar keamanan dan keselamatan kerja di laboratorium mikrobiologi adalah agar mahasiswa (praktikan) mampu menerapkan :

- 1) Pemakaian alat pelindung diri.
- 2) Standar keamanan dan keselamatan di laboratorium mikrobiologi.
- 3) Penanganan kecelakaan kerja di laboratorium mikrobiologi.
- 4) Pengelolaan limbah dan sampah di laboratorium mikrobiologi.

B. Penggunaan Alat Pelindung Diri

Alat pelindung diri (APD) merupakan salah satu sarana yang harus tersedia di laboratorium. Alat ini digunakan untuk melindungi seluruh tubuh, mulai dari badan, mata, pernapasan, dan kaki. Adapun beberapa APD umum yang wajib digunakan yaitu : jas laboratorium, kacamata laboratorium, masker, sarung tangan, dan laboratorium.

Jas laboratorium yang disarankan untuk bekerja di laboratorium mikrobiologi adalah jas laboratorium dengan lengan panjang dan bukaan di depan. Jas ini dirancang untuk melindungi kulit dan pakaian dari bahan kimia ataupun bahan infeksius yang mungkin tumpah. Alat pelindung mata berupa kacamata dan pelindung wajah berupa masker sangat penting digunakan. Alat pelindung mata dan wajah yang baik haruslah nyaman digunakan, tepat digunakan pada mata dan wajah, dan tidak mengganggu aktivitas pemakainya. Peralatan pelindung mata harus mudah dibersihkan dan didesinfeksi untuk menghindari terjadinya kontaminasi akibat cipratan

mikroba patogen yang ada di laboratorium.

Penggunaan sarung tangan sekali pakai harus memperhatikan proses pencucian, pemindahan, pembersihan, dan pencucihamaannya. Sarung tangan harus segera dipindahkan dan tangan harus segera dicuci setelah menangani bahan terinfeksi, setelah melakukan pekerjaan di dalam cabinet *Biosafety*, dan sebelum meninggalkan laboratorium. Sarung tangan sekali pakai harus langsung dimusnahkan bersama limbah laboratorium yang terinfeksi. Petugas laboratorium dianjurkan menggunakan alas kaki atau sepatu yang tertutup dan dapat melindungi kaki. Jenis alas kaki yang tidak boleh digunakan ketika berada di laboratorium antara lain sandal, sepatu tumit tinggi dan sepatu yang terbuka.

C. Standar Keamanan dan Keselamatan di Laboratorium Mikrobiologi

1. Cuci tangan dengan sabun saat masuk dan keluar laboratorium.
2. Dilarang menyimpan dan meletakkan makanan dan minuman, serta merokok di area laboratorium.
3. Sebaiknya menggunakan jas laboratorium lengan panjang dengan kancing di bagian depan agar mudah dibuka.
4. Sebaiknya memakai sepatu khusus yang sesuai dengan kondisi laboratorium.
5. Jauhkan barang yang tidak diperlukan dari area kerja.
6. Bersihkan area kerja dengan alkohol sebelum dan sesudah bekerja.
7. Media / isolate dan lainnya harus diberi label yang jelas.
8. Botol reagen dan botol kultur harus tertutup rapat dan jangan dibiarkan terbuka saat tidak digunakan.
9. Sterilkan peralatan inokulasi dengan api bunsen sebelum dan sesudah digunakan.
10. Perlakukan semua mikroorganisme sebagai patogen potensial dan lakukan tindakan perlindungan yang sesuai.
11. Gunakan sarung tangan saat bekerja dengan mikroorganisme yang berpotensi menyebabkan penyakit.
12. Semua bahan dan peralatan laboratorium harus disterilkan.
13. Jangan menggunakan pipet dengan mulut.
14. Cairan sisa kultur yang tidak terpakai dan semua limbah padat disterilkan dalam Autoclave sebelum dibuang.
15. Kenali lokasi peralatan keselamatan laboratorium (P3K, APAR).
16. Laporkan setiap insiden kecil di laboratorium.

D. Penanganan Kecelakaan Kerja di Laboratorium Mikrobiologi

Di laboratorium mikrobiologi, infeksi bakteri merupakan risiko yang sering terjadi sebagai penyebab penularan utama pada petugas pemeriksa laboratorium, oleh sebab itu perlu diupayakan tindakan pencegahan sebagai berikut :

1. Perlindungan terhadap petugas laboratorium, yaitu dengan membatasi kontaminasi, dekontaminasi petugas, dan dekontaminasi area yang berhubungan dengan kecelakaan kerja tersebut.
2. Dekontaminasi kulit, perawatan harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak merusak kulit.
3. Dekontaminasi mata, yaitu dengan menggunakan air untuk mencegah kontaminasi menyebar dari satu area ke area lainnya.
4. Dekontaminasi pakaian, dilakukan dengan cara melepaskan pakaian yang terkontaminasi sesegera mungkin dan meletakkannya di wadah tertentu. Pakaian harus dipindahkan dari lokasi tumpahan sampai kontaminasi terpantau.
5. Dekontaminasi area kerja, dilakukan dengan membasahi seluruh area yang terkena tumpahan, termasuk wadah yang rusak, dengan desinfektan. Diamkan selama 10 menit, gunakan sarung tangan dan bersihkan dengan tisu atau lap.

Laboratorium harus memiliki kotak peralatan P3K yang lengkap dan menyimpannya di lokasi yang diketahui oleh semua staf laboratorium. Kotak peralatan P3K sebaiknya dilengkapi dengan petunjuk lengkap mengenai pertolongan pada kecelakaan dan dapat dibaca oleh seluruh staf.

E. Pengelolaan Limbah dan Sampah di Laboratorium Mikrobiologi

Limbah dan sampah dari laboratorium perlu ditangani dengan baik dan benar agar tidak merugikan laboran maupun lingkungan sekitar. Tujuan penanganan limbah adalah untuk mengurangi risiko paparan kuman yang menimbulkan penyakit yang mungkin berada dalam limbah tersebut. Limbah medis dan non medis harus dipisahkan. Adapun cara pengelolaan limbahnya sebagai berikut :

1. Limbah medis berupa benda tajam seperti jarum suntik harus dipisahkan dari limbah medis lainnya, dan ditempatkan pada tempat khusus yang standar untuk pembuangan benda tajam.
2. Limbah medis seperti sarung tangan atau masker yang sudah tidak digunakan dibuang ke tempat sampah berbahaya (warna kuning).
3. Limbah medis berupa sisa kultur mikroorganisme dalam cawan petri atau tabung reaksi disterilkan dengan cara perebusan atau *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit sebelum dibuang ke dalam kantong sampah berbahaya (warna kuning). Setelah itu dilakukan pencucian cawan petri dan tabung reaksinya.

4. Buangan cair berupa zat warna dan reagen tidak dibuang ke dalam bak pencucian secara langsung, tetapi dikumpulkan ke dalam botol pengumpul kemudian dibuang ke sampah berbahaya.
5. Sampah berupa kertas, plastik, kapas, yang belum kontak dengan mikroorganisme dibuang ke tempat sampah domestik.
6. Sampah basah berupa sisa medium yang telah disterilkan, kertas dan kapas basah dikumpulkan dalam kantong tersendiri, dan harus dikeluarkan dari ruangan setiap selesai aktivitas.

BAB I

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI KULIT

1.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah sebagai berikut :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit.
- 2) Mahasiswa mampu melakukan pengambilan sampel dari luka terbuka dan luka tertutup.
- 3) Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit.
- 4) Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri penyebab luka infeksi kulit.

1.2. PENDAHULUAN

Kulit terdiri dari dua bagian utama, yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan bagian luar yang tipis, terdiri dari beberapa lapisan sel epitel, dan berfungsi sebagai barrier (penghalang) fisik yang efektif terhadap mikroorganisme. Dermis merupakan bagian dalam kulit yang relatif tebal, sebagian besar terdiri dari jaringan ikat. Folikel rambut, saluran kelenjar keringat, dan saluran kelenjar minyak di dermis merupakan jalur masuk bagi mikroorganisme ke dalam kulit dan menembus jaringan yang lebih dalam.

Pada kulit terdapat mikroorganisme flora normal yang tahan terhadap kondisi kering dan konsentrasi garam yang relatif tinggi. Mikroba normal pada kulit mengandung sejumlah besar bakteri kokus Gram positif, seperti stafilokokus dan streptokokus. Bakteri tersebut cenderung lebih tahan terhadap lingkungan kering, dan tekanan osmotik yang tinggi. Mikroba normal pada kulit juga terdapat kelompok bakteri basil pleomorfik Gram positif, diantaranya *Propionibacterium acnes* bersifat anaerobik dan menghuni folikel rambut, *Corynebacterium xerosis* yang bersifat aerobik dan menempati permukaan kulit. Beberapa bakteri Gram negatif juga terdapat pada permukaan kulit, diantaranya *Acinetobacter*, dan kelompok ragi, seperti *Malassezia furfur*.

Dua genus bakteri, *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, merupakan penyebab umum penyakit kulit dan dapat menghasilkan enzim invasif dan toksin yang merusak. Selain kedua genus bakteri tersebut, bakteri basil Gram negatif juga dapat menyebabkan infeksi kulit, yaitu genus *Pseudomonas* yang tersebar luas di tanah dan air. Bakteri tersebut mampu bertahan hidup di lingkungan yang lembab dan dapat tumbuh pada sisa-sisa bahan organik yang tidak biasa, seperti lapisan sabun atau perekat pelapis tutup botol. *Pseudomonas* resisten terhadap banyak antibiotik dan desinfektan. Spesies yang paling menonjol adalah *Pseudomonas aeruginosa*, yang dianggap sebagai patogen oportunistik.

1.3. PROSEDUR KERJA

1.3.1. Tahap Pra Analitik

Tahap pra analitik terdiri dari enam bagian. Bagian pertama adalah persiapan alat, bahan, dan sampel. Selanjutnya bagian kedua adalah persiapan pasien, bagian ketiga adalah pemberian identitas spesimen, bagian keempat adalah proses pengambilan dan penampungan sampel, bagian kelima adalah penanganan dan pengiriman sampel dan bagian ke enam adalah pengolahan dan penyimpanan spesimen.

a) Persiapan alat, bahan, dan sampel :

Alat yang disiapkan diantara:

- 1) *Autoclave*
- 2) *Biosafety Cabinet*
- 3) Inkubator
- 4) Tabung Kultur dan Rak Tabung
- 5) *Anaerobic Jar*
- 6) Cawan petri
- 7) Sengkelit
- 8) Jangka sorong
- 9) Standar Mc Farland 0.5
- 10) Needle nomor 23
- 11) Bunsen/lampu spirtus
- 12) *Object glass*
- 13) Mikroskop
- 14) Pinset
- 15) Pipet tetes
- 16) Lampiran CLSI

Bahan habis pakai yang disiapkan diantaranya:

- 17) NaCl 0.9%
- 18) Alkohol 70%
- 19) Media Nutrient Broth (Bouillon)
- 20) Media BAP
- 21) Media MC
- 22) Media EMB
- 23) Media MSA
- 24) Media NAS
- 25) Media Biokimia Reaksi

- 26) Media *Thioglycolate*
- 27) Media MHA
- 28) Swab steril
- 29) Oil imersi
- 30) Kertas Saring
- 31) Cat Gram
- 32) Oil Imersi
- 33) Tissue lensa
- 34) H₂O₂ 3%
- 35) Plasma Kelinci
- 36) Disc Antibiotik Penicillin
- 37) Disc Antibiotik Spectinomycin
- 38) Disc Antibiotik Tetracyclin
- 39) Disc Antibiotik Nalidixic Acid
- 40) Disc Antibiotik Ciprofloxacin
- 41) Disc Antibiotik Ceftriaxone
- 42) Sarung Tangan, Masker

Sampel yang disiapkan berupa apus abses/eksudat dari luka infeksi kulit.

b) Persiapan Pasien

Persiapan pasien meliputi hal-hal sebagai berikut :

- 1) Diupayakan pengambilan sampel pada pasien sebelum mendapatkan pengobatan atau terapi antibiotik.
- 2) Pemberian Identitas Spesimen
 - a. Spesimen harus diberi label yang berisi nama pasien dan nomor identifikasi (nomor urut dari rumah sakit/laboratorium) atau tanggal lahir dan sumber lain sebagai identitas pasien tersebut.
 - b. Informasi yang dicantumkan pada label harus jelas dan bisa dicocokkan dengan form permintaan ketika diterima di laboratorium.

c) Pengambilan dan Penampungan Sampel

- 1) Pada Luka terbuka / bula yang pecah / luka bakar
 - a. Luka dicuci dengan larutan fisiologis (NaCl 0.9%).
 - b. Luka didiamkan beberapa saat hingga cairan luka (nanah/eksudat) keluar.
 - c. Dilakukan pengambilan nanah dari dinding luka dengan swab steril.
 - d. Dilakukan swab sepanjang permukaan luka.
 - e. Swab dimasukkan kedalam tabung steril berisi media transport (*Thioglycolate*).

- 2) Pada pustula / vesikel
 - a. Pustula/vesikel dibersihkan permukaannya dengan alkohol 70%.
 - b. Pustula/vesikel dipecahkan dengan *needle* nomor 23, kemudian diswab hingga dasar luka.
 - c. Swab dimasukkan kedalam tabung steril berisi media transport (Thioglycolate).
- 3) Pada abses tertutup
 - a. Abses pada kulit di disinfeksi dengan alkohol 70%.
 - b. Nanah/eksudat diaspirasi dengan spuit 1 mL, kemudian dimasukkan kedalam media transport dan dimasukkan kedalam *anaerobic jar*.
- d) Penanganan dan Pengiriman Sampel
 - 1) Spesimen nanah/abses/eksudat idealnya segera dikirim ke laboratorium 30 menit setelah pengambilan.
 - 2) Spesimen diberi label yang sesuai dengan form permintaan, kemudian spesimen dan form permintaan dimasukkan dalam kantong plastik terpisah.
 - 3) Spesimen dikirimkan ke labortaorium tidak lebih 24 jam pada suhu ruang.
- e) Pengolahan dan penyimpanan spesimen
 - 1) Jika spesimen nanah/eksudat tidak dapat segera diperiksa, maka sampel tersebut harus disimpan terlebih dahulu.
 - 2) Penyimpanan sebelum penanganan untuk spesimen nanah/eksudat sebagai berikut:
 - a. dilakukan pemeriksaan langsung berupa pengamatan mikroskopis Gram, untuk mengamati morfologi bakteri yang terdapat dalam spesimen tersebut.
 - b. media yang digunakan untuk penyimpanan spesimen diantara media Blood Agar/Chocolate Agar/MacConkey Agar.
 - c. penyimpanan spesimen tersebut tidak boleh lebih dari 24 jam dalam suhu ruang.

1.3.2. Tahap Analitik

Tahap analitik terdiri dari lima bagian, yaitu; kontrol kualitas media, kontrol kualitas reagen, persiapan spesimen dan pemeriksaan spesimen, berikut uraiannya :

- a) Kontrol Kualitas Media
 - 1) *Pengujian pH Media*

Media yang telah dibuat dilakukan pengujian pH. Jika pH media terlalu asam, maka ditambah dengan NaOH dan jika pH media terlalu basa maka ditambah dengan H₂SO₄ hingga diperoleh pH yang sesuai dengan ketentuan.
 - 2) *Uji Sterilitas Media*

- a. Media yang telah di sterilisasi, diambil secara acak beberapa kelompok media dan dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 35⁰ – 37⁰C selama 1-2 x 24 jam.
 - b. Jika setelah diinkubasi kelompok media tersebut ditumbuhi oleh lebih dari 2 koloni bakteri per cawan, maka sterilisasi dinyatakan gagal, dan media-media tersebut harus dibuang semua,
 - c. Hasil uji sterilitas media disimpan.
- 3) Uji Kinerja/Performa Medis
- a. Disiapkan suspensi strain bakteri stok dengan kekeruhan setara dengan standar Mc Farland 0.5 dan digunakan 1 mata ose sebagai inokulum
 - b. Diinkubasi pada suhu 35⁰ – 37⁰C selama 24 jam. Jika koloni bakteri tumbuh pada media tersebut, maka performa media masih bagus dan media masih dapat digunakan. Daftar galur stok serta rekomendasi untuk pemeliharaan dan penggunaan stok isolat bakteri di sajikan pada Tabel 1.
 - c. Catatan uji performa media disimpan.

Tabel 1

Galur Stock Yang Direkomendasikan Untuk Pengendalian Kualitas*

<p>Kokus Gram Positif <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212 atau 33186) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i></p>	<p>Enterobacteriaceae <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia enterocolitica</i></p>
<p>Kelompok Bakteri Gram Negatif Fastidious <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipe b Beta Laktamase negatif Beta Laktamase positif <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i></p>	<p>Basil Gram Negatif Lainnya <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>Vibrio cholerae</i> (non-01)</p>
<p>Anaerob <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p>Jamur <i>Candida albicans</i></p>

*Strain yang paling relevan dengan kebutuhan laboratorium yang harus dipilih

b) Kontrol Kualitas Reagen

Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut:

- 1) setiap kali larutan/reagen kerja baru disiapkan dan setiap minggu (hal tersebut terutama untuk pewarna bakteri)
- 2) Reagen harus dibuang ketika:
 - a. Telah kadaluarsa
 - b. Terdapat tanda-tanda kerusakan (kekeruhan, endapan, perubahan warna)

c) Pemeliharaan dan Kalibrasi Instrumen

Dijadwalkan perawatan pemeliharaan rutin pada semua instrumen, karena pengujian kualitas instrumen tidak dapat dilakukan jika instrumen kualitas buruk atau tidak terawat dengan baik. Jadwal perawatan dan pemeliharaan di sajikan pada Tabel 2.

Tabel 2
Kontrol Kualitas Instrumen

Instrumen	Perawatan Rutin	Pemantauan	Pemeliharaan dan Inspeksi Teknis
<i>Autoclave</i>	Dibersihkan dan ganti air tiap bulan	<ol style="list-style-type: none">1. Diperiksa dan disesuaikan level air sebelum pengoperasian/penggunaan2. Catat waktu, suhu, dan tekanan setiap pemakaian3. Catat kinerja autoclave menggunakan indikator biologis (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	Setiap 6 bulan
Oven	Bagian dalam dibersihkan setiap bulan	Waktu dan suhu dicatat untuk setiap proses	Setiap 6 bulan
Mikroskop	<ol style="list-style-type: none">1. Membersihkan lensa dengan tissue lensa setiap setelah digunakan2. Bagian mekanis dibersihkan dan dilumasi setiap minggu3. Beri penutup saat mikroskop tidak digunakan	<ol style="list-style-type: none">1. Kesejajaran kondensor diperiksa setiap bulan2. Diletakkan silica biru dibawah penutup mikroskop untuk mencegah pertumbuhan jamur pada tempat yang lembab	Setiap tahun
Inkubator	Bagian dalam dinding dan rak inkubator dibersihkan setiap bulan	Catat suhu pada setiap awal pemakaian (batasan $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$)	Setiap 6 bulan
Lemari Es	Dibersihkan dan di <i>defrost</i> setiap 2 bulan	Suhu dicatat setiap pagi (suhu yang disarankan $2-8^{\circ}\text{C}$)	Setiap 6 bulan

Catatan : Setiap pengoperasian instrumen agar selalu dicatat pada formulir.

d) Persiapan Spesimen

Persiapan spesimen dilakukan H-1 sebelum praktikum dilakukan

- 1) Spesimen nanah/eksudat dimasukkan kedalam media pemupuk Nutrient Broth (Bouillon)
- 2) Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.

e) Pemeriksaan Spesimen

Hari ke-1

- 1) Dari media pemupuk dibuat preparat dan di cat Gram dan diamati morfologi mikroskopisnya
- 2) Jika pada pengamatan mikroskopis didapatkan hasil:
 - a. Gram negatif, maka dari media pemupuk di subkultur ke media MC dan EMB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam
 - b. Gram Positif, maka dari media pemupuk di subkultur ke media BAP, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam

Hari ke-2

- 1) Diamati morfologi makroskopis koloni bakteri Gram negatif yang tumbuh pada media MC dan EMB, kemudian dicatat. Diambil 1-2 koloni bakteri dari media MC kemudian di subkultur pada media KIA/TSIA dan media uji biokimia reaksi. Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
- 2) Diamati morfologi makroskopis koloni bakteri Gram Positif yang tumbuh pada media BAP, kemudian dicatat. Dilakukan uji katalase metode slide untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* (yang katalase positif) dan *Streptococcus* (yang katalase negatif). Setelah dilakukan uji katalase, selanjutnya diambil 1-2 koloni bakteri dari media BAP dan di subkultur pada media MSA dan NAS. Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
- 3) Cara melakukan uji katalase metode slide test:
- 4) Ditetaskan 1 tetes H₂O₂ 3% pada gelas objek → dengan menggunakan sengkeli, ditambahkan koloni bakteri yang akan diuji secukupnya → dicampur hingga menjadi emulsi → hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas

Hari ke-3

- 1) Dilakukan pengamatan bakteri Gram negatif pada media KIA/TSIA dan media uji biokimia reaksi, kemudian dicatat. Hasil tersebut di cocokkan dengan ciri-ciri biokimia dari *Pseudomonas aeruginosa*. Selanjutnya dilanjutkan dengan uji oksidase untuk membedakan antara famili Psedomonadaceae (oksidase positif) dan Enterobacteriaceae (oksidase negatif)
- 2) Cara melakukan uji oksidase:
- 3) Ditetaskan 2-3 tetes reagen oksidase (tetrametil-para-phenylenediamine 1%) pada

selembar kertas saring dalam cawan petri → diambil 1-2 koloni tersangka *Pseudomonas aeruginosa* dari media TSIA/KIA menggunakan sengkeli → dioleskan melintang pada kertas saring yang telah dibasahi reagen oksidase → hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu tua pada kertas saring dalam waktu 10 detik. **Catatan:** Reagen oksidase harus diuji secara teratur dengan strain kontrol positif dan negatif.

- 4) Dilakukan pengamatan bakteri Gram Positif pada media MSA (diamati adanya fermentasi mannitol) dan diamati warna pigmen pada koloni yang tumbuh di media NAS. Selanjutnya diambil koloni dari MSA untuk dilanjutkan uji koagulase untuk membedakan *Staphylococcus aureus* yang patogen (koagulase positif) dari spesies *Staphylococcus* lain yang tidak patogen pada manusia (koagulase negatif)
- 5) Cara melakukan uji koagulase metode slide test:
- 6) Ditetaskan 1 tetes plasma kelinci pada gelas objek → dengan menggunakan sengkeli, ditambahkan koloni bakteri yang akan diuji secukupnya → dicampur hingga menjadi emulsi → hasil positif ditandai dengan terbentuknya koagulasi plasma
- 7) Uji Resistensi Antibiotik
 - a. Setelah teridentifikasi jenis bakteri yang terdapat dalam spesimen, selanjutnya dilakukan uji sensitivitas bakteri tersebut terhadap beberapa antibiotik.
 - b. Cara ujinya menggunakan uji resistensi antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer) sebagai berikut:
 - i. Dibuat suspensi bakteri uji dengan derajat kekeruhannya di sesuaikan dengan kekeruhan Mc Farland 0.5
 - ii. Subkultur suspensi bakteri uji tersebut dengan menggunakan lidi kapas pada media MHA, sampai seluruh permukaan MHA tertutup rapat dengan goresan, biasanya dilakukan 4 kali goresan dan 1 kali putaran di bagian pinggir MHA, selanjutnya dibiarkan 5 menit supaya suspensi bakteri uji meresap dalam media MHA
 - iii. Ditempelkan disk antibiotik pada permukaan media MHA menggunakan pinset steril, dengan jarak antar disk kurang lebih 15 mm
 - iv. Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam
 - v. Pengukuran luas diameter zona hambat yang di bentuk oleh antibiotik menggunakan jangka sorong.

1.3.3. Tahap Pasca Analitik

- 1) Dilakukan penarikan kesimpulan hasil.
- 2) Dilakukan pembuatan laporan kegiatan praktikum.
- 3) Meja kerja, alat dan bahan yang telah digunakan dirapikan kembali.

1.4. LAPORAN PRAKTIKUM

Identitas Sampel :

Hari ke-0, Tanggal :

- 1) Dilakukan penanaman spesimen kedalam media Nutrient Broth
- 2) Diinkubasi 37°C selama 24 jam

Hari ke-1, Tanggal :

- 1) Dilakukan pembuatan preparat dari media Nutrient Broth, kemudian dilakukan pengecatan Gram

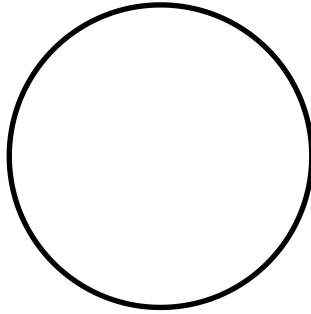
Hasil:

Bentuk :

Susunan :

Warna Sel :

Sifat :



- 2) Jika ditemukan bakteri Gram negatif, dari media NB dilanjutkan untuk disubkultur ke media MC, dan EMB. Jika ditemukan bakteri Gram Positif, dari media NB dilanjutkan untuk disubkultur ke media BAP
- 3) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari ke-2, Tanggal :

- 1) Dilakukan pengamatan morfologi makroskopis koloni bakteri pada media:

- a. MC dan EMB untuk bakteri Gram negatif

Media MC Bentuk :

 Ukuran :

 Warna Koloni :

 Tepi :

 Elevasi :

 konsistensi :

 Fermentasi Laktosa :

Media EMB Bentuk :

 Ukuran :

 Warna Koloni :

 Tepi :

 Elevasi :

 Konsistensi :

Fermentasi Manitol pada media MSA :

Pigmen yang dihasilkan pada media NAS :

Hasil uji koagulase :

Kesimpulan identifikasi: dari sampel nanah/abses/eksudat yang diambil dari luka infeksi kulit ditemukan adanya bakteri

- 3) Setelah teridentifikasi bakteri yang terdapat dalam sampel nanah/abses/eksudat, dilanjutkan dengan uji resistensi bakteri terhadap antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer).

Hari ke-4, Tanggal:

- 1) Pembacaan hasil uji resistensi bakteri terhadap antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer). Luas diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik diukur menggunakan jangka sorong

Disk Antibiotik	Luas Diameter Zona Hambat(mm)	Kategori* (S/I/R)
Penicillin		
Spectinomycin		
Tetracyclin		
Nalidixic Acid		
Ciprofloxacin		
Ceftriaxone		

*Penentuan Kategori menggunakan acuan CLSI, S: Sensitif; I: intermediet; R: Resisten

Pembimbing Praktikum,

Praktikan,

(.....)

(.....)

1.5. EVALUASI

Jawablah pertanyaan berikut ini

- 1) Jelaskan mengapa pengambilan sampel dan pengiriman sampel menjadi salah satu pertimbangan yang penting dalam pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit?
- 2) Jelaskan jika sampel berupa nanah, maka:
 - a. Apa wadah yang harus digunakan?
 - b. Bagaimana syarat pengirimannya?
 - c. Apa saja media yang digunakan?
- 3) Jelaskan bagaimana cara mengambil sampel nanah/eksudat pada luka terbuka/luka bakar!
- 4) Jelaskan bagaimana cara melakukan uji sterilitas media! dan Jelaskan apa fungsi uji tersebut!
- 5) Kapan pengujian kualitas reagen dilakukan?
- 6) Jelaskan Ciri morfologi dari *Pseudomonas aeruginosa* pada media Mac Conkey!
- 7) Interpretasikan hasil media KIA yang ditumbuhi *Pseudomonas aeruginosa* berikut ini:



- 8) A. Jelaskan ciri morfologi dari *Staphylococcus aureus* pada media BAP!
- 9) B. Apa warna pigmen *Staphylococcus aureus* pada media Nutrient Agar?
- 10) Jelaskan bagaimana cara melakukan uji Katalase!
- 11) Jelaskan bagaimana cara melakukan uji Koagulase!

Tabel 3

Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Kulit

Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan

	<p>susunan bakteri nampak jelas</p> <p>4. Tidak ada endapan cat</p>	<p>susunan bakteri nampak jelas</p> <p>4. Tidak ada endapan cat</p>	<p>3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas</p> <p>4. Tidak ada endapan cat</p>	<p>susunan bakteri nampak jelas</p> <p>4. Tidak ada endapan cat</p>
Hasil identifikasi	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>Memenuhi seluruh kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar
Hasil uji resistensi antibiotik	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik
Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	<p>Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali</p>	<p>Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 	<p>Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 	<p>Peserta melakukan 5 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis

		3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kamampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan Media dan reagensia yang digunakan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu

	menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar	menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar	menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar	menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar
	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya

1.6. RINGKASAN

Isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit merupakan proses untuk memisahkan dan mengenali bakteri dari spesimen nanah, yang biasanya dilakukan untuk mendapatkan biakan murni dan mengetahui jenis bakteri penyebab infeksi tersebut. Salah satu proses isolasi bakteri dari spesimen menggunakan teknik *streaking* pada media pertumbuhan yang sesuai. Setelah isolasi, identifikasi dilakukan melalui pengamatan makroskopis koloni, mikroskopis bakteri, uji biokimia, uji-uji tambahan dan atau uji molekuler. Guna memastikan antibiotik yang sesuai perlu dilakukan uji resistensi antibiotik. Hal tersebut penting untuk mengidentifikasi antibiotik yang efektif dalam mengobati infeksi bakteri dan mencegah resistensi antibiotik yang semakin meningkat. Penggunaan antibiotik yang salah dapat menyebabkan infeksi menjadi lebih sulit diobati. Metode Kirby-Bauer merupakan metode umum yang digunakan untuk menguji kepekaan bakteri. Metode ini melibatkan penanaman bakteri pada media agar, selanjutnya ditempatkan disk antibiotik di atasnya, setelah inkubasi, zona hambatan diukur. Ukuran zona hambatan menunjukkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Interpretasi hasil uji resistensi antibiotik dikategorikan dengan sensitif, resisten, dan intermediet.

1.7. GLOSARIUM

EMB : Eosin Methylen Blue

MC : Mac Conkey

BAP : Blood Agar Plate

MSA : Mannitol Salt Agar

TSIA : Triple Sugar Iron Agar

KIA : Kligler Iron Agar

NAS : Nutrient Agar Slant

MHA : Mueller Hinton Agar

H₂O₂ : Hidrogen peroksida

NaCl 0.9% : Larutan garam fisiologis yang mengandung 0,9 g garam (NaCl) per 100 mL larutan atau 9 g per Liter.

ATCC : American Type Culture Collection

1.8. DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., and Meitzner, T. A. 2013. Jawetz, Melnick, & Adelberg's: Medical Microbiology. 26th Ed. McGraw-Hill.
- Leboffe, M.J., and Pierce, B.E. 2011. A Photographic for The Microbiology Laboratory. 4th Ed. Morton Publisher. USA.
- Sumarno. 2000. Identifikasi Bakteriologi Klinik. AAK Yogyakarta.
- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., and Heuck, C. C. 2003. Basic Laboratory Procedures In Clinical Bacteriology. 2nd Ed. World Health Organization. Geneva.

BAB II

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI SALURAN GASTROINTESTINAL

2.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah :

- 1) Menjelaskan karakteristik umum bakteri penyebab infeksi pada saluran gastrointestinal.
- 2) Menerapkan teknik pengambilan dan pengolahan sampel yang sesuai.
- 3) Melakukan Teknik biakan murni dan identifikasi laboratorium terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*., *Shigella dysentriae*., dan *Vibrio cholerae*.
- 4) Menganalisis hasil pemeriksaan secara akurat dan menyusun laporan praktikum sesuai standar jurnal laboratorium klinik.

2.2. PENDAHULUAN

Enterobacteriaceae merupakan kelompok bakteri Gram-negatif berbentuk basil yang hidup secara fakultatif anaerob dan umumnya ditemukan pada saluran cerna manusia serta hewan. Kelompok ini mencakup beberapa genus patogen penting seperti *Escherichia*, *Salmonella*, dan *Shigella*. Sementara itu, *Vibrio cholerae* termasuk dalam famili Vibrionaceae, tetapi memiliki karakteristik klinis yang serupa karena menyebabkan diare akut dan sering dilibatkan dalam uji diagnostik gastrointestinal.

Escherichia coli berbentuk basil pendek, Gram-negatif dengan susunan satu-satu kadang berbentuk rantai, pada medium Mac Conkey. *E. Coli* membentuk koloni bulat, konvek, berwarna merah, halus, pinggiran rata. Bakteri kelompok Enterobacter koloninya mirip *E.coli* tapi sedikit lebih mucoid, sedangkan *Klebsiella* koloninya besar dan sangat mucoid. Pada Endo Agar *E.coli* tampak warna Merah kilat metalik, pada EMB disertai adanya merah hijau kilat metalik diatas permukaan koloninya hal ini menandakan adanya asam dan gas yang dihasilkan oleh bakteri. Untuk membedakan *E.coli* dengan *Enterobacter aerogenes*, dilakukan uji IMVIC = Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, *Simmon's Citrate* (*E.coli* : + + - - , *E.aerogenes* : - - + +).

Escherichia coli merupakan flora normal usus, namun beberapa strain seperti EHEC, EPEC, dan ETEC dapat bersifat patogen dan menyebabkan penyakit seperti diare berdarah, kolitis, dan infeksi saluran kemih. Identifikasi laboratorium biasanya dilakukan melalui pewarnaan gram, pembiakan atau kultur, uji fermentasi laktosa, uji IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, dan Citrate), serta uji lainnya seperti serologi.

Salmonella merupakan patogen enterik yang menyebabkan gastroenteritis dan demam tifoid. Pengujian dilakukan melalui kultur pada media selektif seperti *Salmonella-Shigella* agar

dan uji serologi terhadap antigen O dan H.

Shigella dapat menyebabkan disentri basiler dan memiliki karakteristik tidak motil, tidak menghasilkan gas dari glukosa, serta uji indole yang bervariasi tergantung spesies. Media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dan XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) digunakan untuk seleksi dan identifikasi awal.

Vibrio cholerae merupakan bakteri koma, Gram-negatif, penyebab kolera yang ditandai dengan diare berair masif dengan faeces khas cair seperti cucian air beras. Uji kultur pada TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*) dan uji oksidase positif menjadi langkah utama dalam identifikasinya.

2.3. PROSEDUR KERJA

Prosedur kerja praktikum pada materi ini dibagi menjadi 3 bagian yaitu tahap pra analitik meliputi persiapan alat dan bahan praktikum, prosedur penanganan spesimen klinis dan teknik pembuatan biakan murni. Tahap analitik meliputi teknik pembuatan biakan murni, serta isolasi dan identifikasi bakteri, *Escherichia coli*, *Salmonella Shigella* dan *Vibrio cholera*. Tahap pasca analitik meliputi pelaporan hasil, identifikasi sumber kesalahan pemeriksaan dan jaminan mutu pemeriksaan

2.3.1. Tahap Pra Analitik

Tujuan tahap ini adalah memastikan pengambilan, penanganan dan transportasi spesimen klinis dilakukan dengan benar untuk mendukung akurasi hasil pemeriksaan bakteri patogen penyebab infeksi saluran gastrointestinal.

a) Persiapan alat, bahan, dan spesimen :

Alat

1) Wadah Steril, tahan bocor dan bertutup rapat seperti pada gambar berikut ini :



Gambar 1. Wadah Tinja Steril

Sumber : <https://id.bossgoo.com/product-detail/medical-disposable-stool-sample-container-54154403.html>

- 2) Autoclave
- 3) *Biosafety Cabinet*
- 4) Inkubator
- 5) Tabung Kultur dan Rak Tabung
- 6) Cawan petri

- 7) Sengkelit
- 8) Bunsen/lampu spiritus
- 9) Object glass
- 10) Mikroskop
- 11) Pinset
- 12) Pipet tetes
- 13) Tabung durham
- 14) Kasa

Bahan

- 1) Sarung tangan sekali pakai
- 2) Ketrans label
- 3) Formulir permintaan pemeriksaan,
- 4) Medium transport jika diperlukan misalnya *Cary-Blair Transport Medium* untuk penundaan lebih dari 2 jam.
- 5) Media (MCA (*Mac Conkey Agar*),
- 6) Media SSA (*Salmonella Shigella Agar*),
- 7) Media EMBA (*Eosin Metylen Blue Agar*)
- 8) Media AD
- 9) Media TCBS
- 10) Media TSIA
- 11) VITEX
- 12) Cat Gram,
- 13) media TSB,
- 14) Selenite Broth,
- 15) ,Media Gula-gula Glukosa, laktosa, maltose, mannitol, sukrosa,
- 16) MR
- 17) VP
- 18) SC
- 19) Semisolid/SIM,
- 20) Urea
- 21) API 20E
- 22) Antisera EPEC Polivalen,
- 23) Disk antibiotik.

Spesimen klinis

Spesimen klinis adalah tinja atau *rectal swab* pada pasien dengan ketentuan yaitu, hindari penggunaan antibiotik minimal 48-72 jam sebelum pengambilan, kecuali dalam keadaan darurat. Bila memungkinkan lakukan pengambilan saat fase akut infeksi (di saat diare aktif).

- 1) Prosedur penanganan spesimen klinis
 - a. Mintalah pasien buang air besar langsung ke wadah bersih dan kering (bukan ke toilet atau diaper)
 - b. Gunakan sendok spatula steril bawaan dari wadah untuk mengambil bagian tinja yang mengandung darah atau lender.
 - c. Ambil sebesar volume ± 5 gram atau sebesar kacang tanah.
 - d. Hindari kontaminasi dengan urin atau air.
 - e. Beri label lengkap dengan identitas pasien.
 - f. Kirim spesimen sesegera mungkin (< 2 jam) bila ditunda simpan pada suhu 4°C dalam media Cary-Blair (jangan bekukan spesimen).
 - g. Lengkapi formulir permintaan dengan data klinis yang relevan (seperti : demam, durasi diare, antibiotik yang telah digunakan.
 - h. Kriteria penolakan spesimen : Wadah bocor atau pecah, spesimen bercampur urin, spesimen > 24 jam tanpa medium transport, formulir permintaan tidak lengkap.

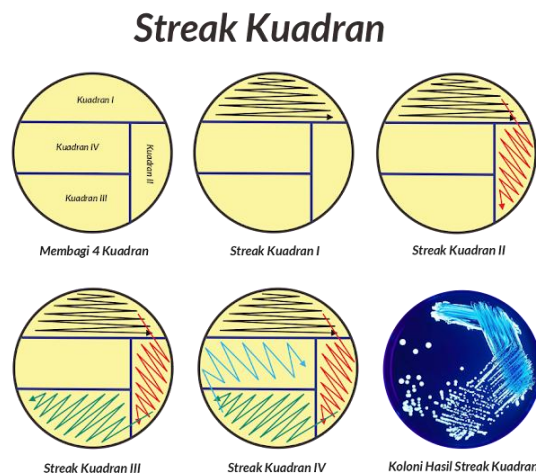
2.3.2. Tahap Analitik

a) Teknik pembuatan biakan murni

Tujuan tahap ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri dalam bentuk biakan murni yaitu biakan yang hanya mengandung satu jenis bakteri. Adapun metode yang diterapkan adalah *Streak Plate Method* (cawan gores). *Streak Plate Method* adalah teknik inokulasi bakteri pada media yang berada pada cawan petri dengan cara mengorekskan inokulum secara bertahap menggunakan ose steril pada media padat, dengan teknik penipisan secara mekanik setiap kuadran jumlah bakteri yang ditransfer semakin berkurang sehingga memungkinkan memungkinkan koloni tumbuh terpisah (*koloni tunggal*), yaitu koloni yang dihasilkan dianggap berasal dari satu sel bakteri, sehingga dapat diambil untuk biakan murni. Berikut ini adalah prosedur teknik pembuatan biakan murni

- 1) Siapkan media agar plat dalam cawan petri.
- 2) Tandai bagian bawah dengan identitas pasien.
- 3) Sterilkan ose dengan membakar kawat sampai membara, kemudian dinginkan beberapa detik.
- 4) Ambil sedikit suspensi bakteri dengan ose, kemudian goreskan ose pada kuadran

pertama permukaan agar dan lakukan penipisan goresan sesuai dengan pola 4- 5 kuadran. Seperti yang diilustrasikan pada gambar di bawah ini.



Gambar2 Teknik Goresan untuk Biakan Murni

Sumber : <https://www.microbeholic.com/2022/09/metode-cawan-gores-streak-plate.html>

- 5) Tutup cawan petri, inkubasikan media dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - 6) Amati pertumbuhan dan pilih koloni tunggal yang terpisah untuk dipindahkan pada media baru sebagai biakan murni.
- b) Isolasi dan Identifikasi bakteri

Tujuan dari prosedur ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang berasal dari suatu spesimen. Metode yang digunakan adalah kultur, di mana bakteri ditumbuhkan pada media pengkayaan serta media agar diferensial atau selektif dalam kondisi aerob dan suhu optimum, menggunakan teknik goresan. Setelah proses inkubasi selama 24–48 jam, diharapkan terbentuk koloni tunggal dengan karakteristik khas. Koloni ini kemudian diidentifikasi lebih lanjut berdasarkan sifat biokimia, uji serologis, keberadaan gen virulensi spesifik, serta profil kepekaannya terhadap antibiotik. Berikut tahapan proses isolasi dan Identifikasi bakteri :

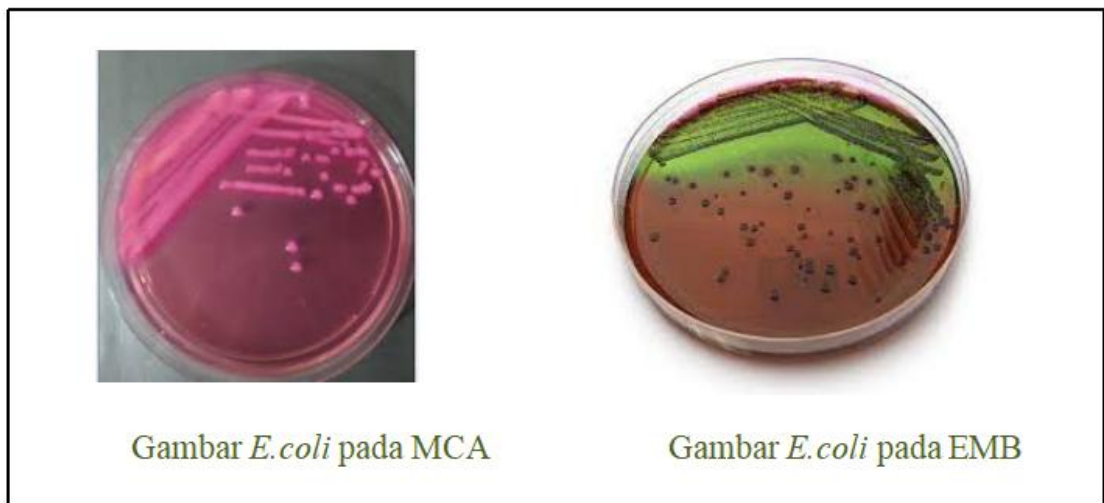
Hari I

Inokulasikan spesimen pada TSB/Selenit Broth, Mac Conkey, EMB, SS, TCBS lalu inkubasikan selama 24 jam suhu 37°C secara aerob.

Hari II

- 1) Lakukan pengamatan karakteristik sifat koloni *E.coli* yang, dengan ciri pertumbuhan pada masing-masing media adalah sebagai berikut :
 - a. MC : sedang besar, keeping cembung, merah keruh, smooth

- b. EMB : sedang keeping, hijau metalik tengah ungu tua, smooth
- c. ENDO : besar, cembung, merah tua metalik, smooth



Gambar 3. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Koloni *E. coli* Pada Hari Ke 2

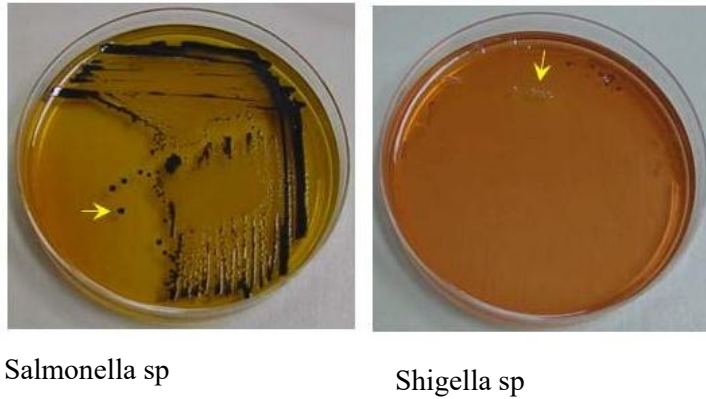
Keterangan :

Media MC mengandung laktosa, garam empedu, dan indikator pH (neutral red). Fermentasi laktosa menghasilkan asam → menurunkan pH → **koloni berubah menjadi merah muda hingga merah**. Koloni non-laktosa fermenter (seperti *Salmonella*, *Shigella*) → tetap bening/transparan. Garam empedu dan crystal violet menghambat bakteri Gram Positif → selektif untuk Gram negatif. Warna merah pada media EMB disebabkan karena kemampuan memfermentasi laktosa menghasilkan asam (pH rendah). Eosin Y adalah zat warna yang merespon perubahan warna menjadi warna tua. Eosin Y dan methylen blue adalah indikator pH yang bergabung membentuk endapan ungu tua apabila pH rendah dan berfungsi juga menghambat pertumbuhan bakteri gram Positif. Sedangkan MC mengandung indikator neutral red sehingga tidak akan membentuk koloni metalik

Inokulasikan koloni terduga *E.coli* yang tumbuh pada media EMB pada media uji-uji biokimia gula-gula bonterey panjang inkubasikan 37°C selama 24 jam, kecuali pada media semisolid pada 25°C /suhu ruang.

- 2) Lakukan pengamatan karakteristik sifat koloni bakteri pada media Salmonella dan Shigella agar (SSA) dengan ketentuan sebagai berikut :
 - a. Sifat koloni yang tumbuh pada bakteri *Salmonella sp.* : bulat, smooth, cembung, ukuran sedang besar (2-4 mm) transparan titik hitam di tengah koloni (*black of center*), non laktosa fermenter.
 - b. Sifat koloni yang tumbuh pada bakteri *Shigella sp* : bulat, smooth, cembung, ukuran kecil (1-2 mm) transparan/bening, non laktosa fermenter.

Berikut ini disajikan gambar karakteristik pertumbuhan bakteri pada media Salmonella-Shigella agar.



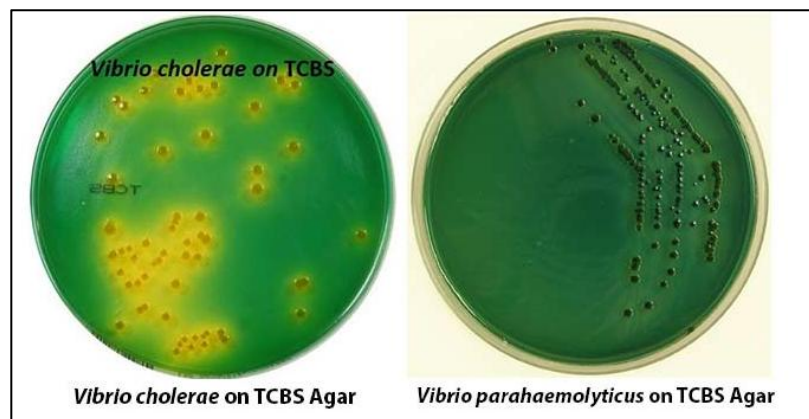
Gambar 4. Karakteristik Bakteri pada Media Salmonella-Shigella Agar
 Sumber : <https://microbeonline-com>

Keterangan :

SS Agar mengandung bile salt dan brilliant green untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram Positif dan sebagian besar flora usus normal. *Salmonella* **tidak memfermentasi laktosa**, sehingga koloni tetap **bening**. Karena *Salmonella* menghasilkan **hidrogen sulfida (H₂S)** dari thiosulfate, maka terbentuk **presipitasi FeS** berwarna hitam di pusat koloni. Beberapa strain *Salmonella* yang tidak memproduksi H₂S mungkin tidak menunjukkan titik hitam.

- 3) Lakukan pengamatan karakteristik sifat koloni bakteri pada media TCBS dengan ketentuan sebagai berikut :
- Vibrio cholera* : Bulat, halus, cembung, sedang-besar, **kuning cerah**, positif memfermentasikan sukrosa.
 - Vibrio parahaemolyticus/Vibrio spp.* : Bulat, halus, cembung, sedang-kecil, **hijau kebiruan**, negatif tidak memfermentasikan sukrosa.

Berikut ini disajikan gambar karakteristik pertumbuhan bakteri pada media TCBS.



Gambar 5. Karakteristik Koloni *Vibrio* spp pada media TCBS
 Sumber : <https://microbiologyinfo.com>

Keterangan :

TCBS mengandung **Sukrosa** sebagai sumber fermentasi. **Bromthymol blue** dan **thymol blue** sebagai indikator pH. **Thiosulfate** dan **citrate**, serta **bile salts** untuk menghambat Gram-positif dan flora non-*Vibrio*. *V. cholerae*: Fermentasi sukrosa menghasilkan asam → menurunkan pH → warna media berubah jadi **kuning** di sekitar koloni. *V. parahaemolyticus*: Tidak fermentasi sukrosa → pH tetap → koloni tampak **hijau atau kehijauan**.

- 4) Lakukan inokulasi koloni terduga *Salmonella sp* dan *Shigella sp* yang tumbuh pada media TCBS ke media : TSIA/KIA, Manitol, gerak/Semisolid/SIM, Indol dan Simmon Citrat.
- 5) Amati karakteristik mikroskopis pewarnaan Gram dari masing-masing media kultur.

Hari III

- 1) Lakukan pengamatan pada biakan terduga *E.coli* yang tumbuh pada media media uji- uji biokimia gula-gula bonterey panjang dan media semisolid Hasil uji biokimia positif *E.coli* adalah sebagai berikut :

TSIA	: K/K, Gas + H ₂ S-	Semisolid	: (+)
Glukosa	: (+/-)	Urea	: (-)
Laktosa	: (+)	Indol	: (+)
Manitol	: (+)	MR	: (+)
Maltosa	: (+)	VP	: (-)
Sakarosa	: (+)	Simmon citrate	: (-)

Keterangan :

Fermentasi *E.coli* pada media gula-gula menghasilkan asam + gas CO₂ dan H

- 2) Lakukan pengamatan hasil pada masing-masing koloni tersangka *Salmonella sp.* dan *Shigella sp.* dari setiap deret gula gula dan uji biokimia lainnya. Hasil uji biokimia positif bakteri *Salmonella sp.* dan *Shigella sp.* disajikan pada Tabel berikut :

Tabel 4
Hasil uji biokimia positif bakteri *Salmonella sp.* dan *Shigella sp*

TSIA	MANITOL	INDOL	SEMI SOLID	SC	ENTEROBACTERIACEAE
A/K H ₂ S	+	-	+	-	<i>Salmonella typhi</i>
A/K H ₂ S -	+G	-	+	-	<i>Salmonella paratyphi A</i>
A/K H ₂ S ++	+G	-	+	+	<i>Salmonella paratyphi B</i>
A/K H ₂ S +	+G	-	+	+	<i>Salmonella paratyphi C</i>
A/K H ₂ S -	+	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
A/K H ₂ S -	+	+/-	-	-	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>
A/K H ₂ S -	-	-	-	-	<i>Shigella shigae</i>
A/K H ₂ S -	-	-	-	-	<i>Shigella schmitzii</i>
K/A H ₂ S -	+	-	-	+	<i>Vibro cholerae</i>
K/K H ₂ S -	+/-	-	+/-	+	<i>Pseudomonas aeruginosae</i>

Keterangan :

- A : Acid; Kuning, asam
- K : Alkaline; Merah (lereng) basa
- +/- : Sedikit
- ++ : Banyak terbentuk/kuat
- G : Positif gas
- : Negatif

- 3) Lakukan pengamatan hasil uji biokimia pada masing-masing koloni tersangka *Vibrio* sp. Hasil uji biokimia positif *Vibrio* sp. disajikan pada Tabel berikut :

Tabel 5
Hasil uji biokimia positif *Vibrio* sp.

Uji Biokimia	Prinsip	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Oksidase	Deteksi enzim sitokrom C oksidase	-	+
Katalase	Deteksi enzim katalase	+	+
Motilitas	Pergerakan bakteri	+	+
TSIA	Fermentasi tiga gula : glukosa, laktosa, sukrosa	K/A,Gas+/-,H ₂ S-	K/A,Gas+/-,H ₂ S-
Indol	Produksi Indol dari triptofan	+	-
Urease	Produksi enzim urease	-	-
Simmons Citrate	Mendeteksi produksi enzim citrase atau citrate desmolase	+	+
MR	Mendeteksi fermentasi glukosa menjadi asam (pH 5).	+	+
VP	Mendeteksi pemecahan glukosa menghasilkan produk netral berupa asetilmetil karbionol atau asetoin	+	+
Sukrosa	Fermentasi sukrosa menghasilkan asam	+	-
NaCl Toleransi	Pertumbuhan pada berbagai konsentrasi garam (1-10%)	Tumbuh di 0-6%	Tumbuh di 3-8% (halofilik)

- 4) Untuk identifikasi akhir dilakukan tes serologi antisera polivalen dan monovalen :

Jenis antisera :

- a. EPEC : Polivalen I – XI, EPEC I – V, EPEC VI – XI
- b. EPEC : Monovalen type : I, II, III XI.
- c. EPEC : Test antisera spesifik *E.coli* patogenik polivalen type I – XI, lanjutkan
- d. pada type I – V dan VI – XI, kemudian untuk menentukan typenya lakukan uji serologi terhadap antisera *E.coli* potogen monovalent type I – XI, sehingga diperoleh type bakteri.
- e. ETEC : Toksin Heat Labil (LH) diperiksa dengan hewan percobaan
- f. EIEC : Sereny Test
- g. EHEC : Uji biokimia dengan sorbitol Mc. Conkey

Ada sebelas type *E.coli* enteropatogenik yang menyebabkan diare terutama pada neonates dan bayi yaitu : Type I – XI.

Ada 11 macam type spesifik *Escherichia coli* patogenik (EPEC) yaitu :

Type I	: Stoke W	O111	: K58 (B)
Type II	: 972 NCTC	O55	: K59 (B)
Type III	: F41 NCTC	O26	: K60 (B)
Type IV	: E990 NCTC	O86	: K61 (L)
Type V	: 8623 NCTC	O125	: K70 (B) H19
Type VI	: 8623 NTCT	O126	: K71 (B) H19
Type VII	: 9707 NCTC	O127	: K63 (B)
Type VIII	: 9708 NCTC	O128	: K67 (B) H2
Type IX	: 9114 NCTC	O114	: K (B) H32
Type X	: 9705 NCTC	O119	: K69 (B) H18
Type XI	: C771 NCTC	O142	: K86 (B) H6

c) Uji Serologi

Uji serologi dilakukan dengan menggunakan antisera spesifik dengan menguji koloni yang tumbuh di media MCA atau dari media KIA/TSIA. Uji serologi untuk mendeteksi *Enteropatogenic Escherichia coli* (EPEC) umumnya dilakukan dengan uji aglutinasi menggunakan antibodi spesifik terhadap antigen permukaan O (somatik) dan H (flagel) dari bakteri *E. coli*. Uji serologi EPEC bertujuan untuk mendeteksi serotipe *E. coli* enteropatogenik dilakukan dengan cara :

- 1) Teteskan suspensi bakteri dan campur dengan antisera monospesifik anti-O atau anti-H pada slide kaca.
- 2) Goyang-goyangkan slide secara perlahan selama beberapa detik hingga 1 menit.
- 3) Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya aglutinasi (penggumpalan) yang terlihat secara visual. Reaksi negatif ditandai dengan tidak adanya aglutinasi.
- 4) Interpretasikan serotipe EPEC, ditentukan berdasarkan pola aglutinasi dengan antisera tertentu.

2.3.3. Tahap Pasca Analitik

a) Pelaporan hasil

Lakukan pelaporan hasil identifikasi pada jurnal yang telah disediakan laboratorium, tuliskan informasi-informasi penting seperti : Jenis spesimen, kesimpulan Genus atau spesies hasil Identifikasi, Uji sensitivitas, dll.

b) Identifikasi sumber kesalahan pemeriksaan

Sumber kesalahan yang kemungkinan dapat ditemukan selama tahapan identifikasi adalah sebagai berikut :

- 1) Spesimen tidak disimpan atau dikirim sesuai suhu yang dianjurkan (suhu kamar atau pendingin tergantung permintaan).
- 2) Pengambilan spesimen tidak sesuai waktu ideal (misalnya, setelah terapi antibiotik dimulai).
- 3) Kesalahan inokulasi media (jumlah inokulum terlalu banyak atau terlalu sedikit).
- 4) Salah interpretasi morfologi koloni atau reaksi biokimia.
- 5) Kontaminasi silang sampel.
- 6) Penulisan atau pelaporan salah nama spesies atau hasil resistensi.
- 7) Penggunaan singkatan yang tidak jelas atau berbeda interpretasi.

c) Jaminan mutu pemeriksaan

Berikut adalah kontrol kualitas yang dapat dilakukan untuk melakukan isolasi dan identifikasi bakteri :

- 1) Internal Quality Control (IQC):
- 2) Menggunakan strain kontrol seperti *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 untuk validasi media dan reagen. Melakukan pemeriksaan duplo untuk koloni meragukan.
- 3) External Quality Assessment (EQA):
- 4) Berpartisipasi dalam program uji banding antar laboratorium dari instansi akreditasi.
- 5) Prosedur Standar Operasional (SOP):
- 6) Semua tahap kerja harus terdokumentasi dan dilakukan sesuai SOP yang diperbaharui secara berkala. Pelatihan rutin personel laboratorium.
- 7) Review dan Validasi Hasil:
- 8) Semua hasil dikaji ulang oleh analis senior atau supervisor mikrobiologi sebelum

dilaporkan. Hasil yang mencurigakan dikonfirmasi ulang atau dikomunikasikan dengan penanggungjawab laboratorium.

2.4. LAPORAN PRAKTIKUM

Hari I

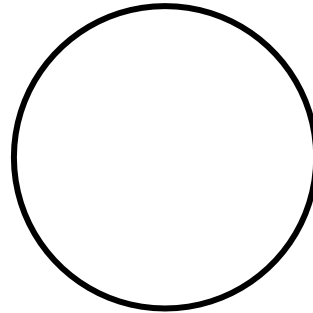
Bahan pemeriksaan dilakukan Direct Preparat dengan pewarnaan gram, hasil :

Bentuk :

Susunan :

Sifat :

Bakteri :



Bahan pemeriksaan kemudian ditanam pada media :

- a)
- b)
- c)
- d)
- e)
- f)
- g)

Setelah diinkubasi 24 jam pada suhu optimum 37⁰C, secara aerob, hasil pengamatan selanjutnya dilaporkan pada Tabel berikut ini :

Hari II

- a) Media Cair : TSB (*Trypticase Soy Broth*) Hasil :
- b) Media Cair : Selenite Broth
Hasil :
- c) Media Cair : Alkali Pepton
Hasil :
- d) Media Plate

Hasil

Nama Media	MCA	EMBA
Nomor/kode Koloni Tunggal			
Bentuk			
Ukuran/diameter			
Warna			
Elevasi			
Sifat			
Jenis bakteri			

Lanjutan ;

Nama Media	SSA	TCBS
Nomor/kode Koloni Tunggal			
Bentuk			
Ukuran/diameter			
Warna			
Elevasi			
Sifat			
Jenis bakteri			

Hari III

Hasil Uji Biokimia koloni terduga *Escherichia coli* :

Nama Media/Uji	Pembaca Hasil
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	

9.	
10	
11.	
12.	
13.	

Hasil Uji Biokmia koloni terduga *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* :

Nama Media/Uji	Pembaca Hasil
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Hasil Uji Biokmia koloni terduga *Vibrio cholerae* :

Nama Media/Uji	Pembaca Hasil
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Hasil Uji Serologi :

Koloni tunggal di duga *E.coli* diambil dari media TSIA/KIA dan disuspensikan dengan antiserta spesifik pada slide (test) sedangkan kontrol koloni disuspensikan dengan NaCl fisiologis steril :



Hasil test :

Kontrol

Kesimpulan :

Diagnosa Bakteriologik :

Dari spesimen ID nomor : didapatkan bakteri
patogen

spesies :
.....
.....

Pembimbing Praktikum,

Praktikan,

(.....)

(.....)

2.5. EVALUASI

- 1) Bagaimana karakteristik umum morfologi mikroskopis dan pertumbuhan bakteri penyebab infeksi pada saluran gastrointestinal ?
- 2) Apa saja hal-hal yang penting diperhatikan dalam teknik pengambilan spesimen tinja ?
- 3) Bagaimana pola teknik biakan murni untuk memperoleh koloni tunggal, agar memudahkan dalam identifikasi bakteri ?
- 4) Gambarkan skema identifikasi bakteri gram negatif basil pada spesimen tinja ?

Tabel 6
Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Gastrointestinal

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil identifikasi	Memenuhi 1-3 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan Teknik biakan murni sampai memperoleh koloni tunggal 3. Melakukan uji biokimia dan pembacaan hasil	Memenuhi 1-4 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan Teknik biakan murni sampai memperoleh koloni tunggal 3. Melakukan uji biokimia dan pembacaan hasil 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 1-5 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan Teknik biakan murni sampai memperoleh koloni tunggal 3. Melakukan uji biokimia dan pembacaan hasil 4. Melakukan Uji serologi atau oxidase dengan benar 5. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 1-6 kriteria sebagai berikut: 1. Memenuhi seluruh kriteria sebagai berikut: 2. Melakukan Teknik biakan murni sampai memperoleh koloni tunggal 3. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 4. Melakukan uji biokimia dan pembacaan hasil 5. Melakukan Uji serologi atau oxidase dengan benar 6. Melakukan

				penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar
Hasil uji serologi	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik
Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kemampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi gastrointestinal 3. Mampu menjelaskan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan

	cara uji biokimia dengan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji serologi dan cara pembacaannya	menjelaskan cara uji biokimia dengan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji serologi dan cara pembacaannya	menjelaskan cara uji biokimia dengan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji serologi dan cara pembacaannya	cara uji biokimia dengan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji serologi dan cara pembacaannya
--	---	---	---	---

2.6. RINGKASAN

Enterobacteriaceae dan *Vibrio cholerae* merupakan patogen penting penyebab infeksi saluran cerna. Praktikum ini melatih mahasiswa dalam keterampilan teknis dan interpretasi hasil identifikasi bakteri patogen tersebut dengan mengikuti tahapan pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik yang sesuai. Langkah Isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi pada saluran gastrointestinal dapat dilakukan melalui tahap ;

- 1) Pewarnaan Gram
- 2) Pemiakan/Kultur
- 3) Uji Biokimia : Gula-gula, API 20E; VITEX
- 4) Uji Kepekaan antibiotik : Kirbby-Bauer: VITEX2
- 5) Uji Serologi
- 6) PCR

2.7. GLOSSARY

- EPEC : Enteropatogenic *Escherichia coli*. Strain *E. coli* penyebab diare pada bayi; menyebabkan destruksi mikrovilus usus tanpa produksi toksin.
- EHEC : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Strain patogenik yang menghasilkan toksin Shiga, dapat menyebabkan kolitis hemoragik dan sindrom uremik hemolitik (HUS).
- EIEC : Enteropathogenic *Escherichia coli*. Strain *E. coli* yang menyerupai *Shigella* dalam kemampuan invasi ke sel epitel usus dan menyebabkan diare berdarah
- ID/AST : Identification / Antibiotic Susceptibility Testing. Proses identifikasi mikroorganisme dan uji kepekaan terhadap antibiotik.
- TSB : Tryptic Soy Broth. Media cair nonselektif untuk perbanyakan bakteri sebelum diuji lebih lanjut.
- Serotype : Identifikasi berdasarkan antigen permukaan (O, H, K) menggunakan antisera spesifik.
- PCR : Polymerase Chain Reaction. Teknik molekuler untuk amplifikasi DNA bakteri spesifik untuk identifikasi genetik.
- RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction. PCR dengan deteksi real-time, memungkinkan kuantifikasi gen target secara cepat.
- API : Analytical Profile Index. Sistem untuk uji biokimia identifikasi bakteri berdasarkan profil metabolik.
- VITEX : VITEK Automated System. Alat otomatis untuk identifikasi bakteri dan uji resistensi antibiotik berbasis kartu biokimia.

EMB	: Eosin Methylen Blue. Media selektif dan diferensial untuk gram negatif, khususnya <i>E. coli</i> (koloni hijau metalik).
MC	: Mac Conkey. Media diferensial untuk enterobacteriaceae, membedakan fermentasi laktosa (pink untuk positif).
MR	: Methyl Red Test. Uji biokimia untuk mendeteksi produksi asam yang stabil dengan pH rendah dari fermentasi glukosa (warna merah = positif).
VP	: Voges-Proskauer Test. Uji biokimia untuk deteksi produksi aseton dari fermentasi glukosa (warna merah muda/coklat = positif).
SC	: <i>Simmons Citrate</i> . Uji penggunaan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (warna biru = positif).
SIM	: Sulfide Indole Motility. Media untuk uji produksi H ₂ S, indol, dan motilitas.
TSIA	: Triple Sugar Iron Agar. Media uji fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, produksi gas dan H ₂ S.
KIA	: Kligler Iron Agar. Mirip TSIA tapi hanya mengandung glukosa dan laktosa; uji fermentasi dan produksi H ₂ S.
ATCC	: American Type Culture Collection Koleksi referensi strain mikroorganisme standar internasional untuk kontrol kualitas.

2.8. DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., and Meitzner, T. A. 2013. Jawetz, Melnick, & Adelberg's: Medical Microbiology. 26th Ed. McGraw-Hill.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (28th ed., CLSI Supplement M100).
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2016). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (13th ed.). Elsevier.
- Leboffe, M.J., and Pierce, B.E. 2011. A Photographic for The Microbiology Laboratory. 4th Ed. Morton Publisher. USA.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2022). Sherris Medical Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill Education.
- Sumarno. 2000. Identifikasi Bakteriologi Klinik. AAK Yogyakarta.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2020). Microbiology: An Introduction (13th ed.). Pearson.
- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., and Heuck, C. C. 2003. Basic Laboratory Procedures In Clinical Bacteriology. 2nd Ed. World Health Organization. Geneva.
- WHO. (2018). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Patogens of Public Health Importance in the Developing World. World Health Organization

BAB III

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI PERNAFASAN

3.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah :

- a. Mahasiswa mampu mempersiapkan media dan reagen serta instrumen yang dibutuhkan dalam proses identifikasi bakteri
- b. Mahasiswa mampu melakukan pengelolaan sampel
- c. Mahasiswa mampu menyimpulkan jenis bakteri dilihat dari hasil karakteristik ujinya
- d. Mahasiswa mampu melakukan proses jaminan mutu pemeriksaan bakteriologi.
- e. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan

3.2. PENDAHULUAN

Infeksi saluran pernafasan merupakan penyakit yang sering dijumpai dengan manifestasi ringan sampai berat. Infeksi saluran pernapasan akut yang mengenai jaringan paru-paru atau ISPA berat, dapat menjadi pneumonia. Penyakit Infeksi Saluran Pernapasan Akut terbanyak diderita oleh anak- anak baik di negara berkembang atau maju dan sudah mampu dan banyak dari mereka perlu masuk rumah sakit karena penyakitnya cukup gawat. Infeksi Saluran Pernapasan dibagi menjadi 2 di antaranya adalah:

1. Infeksi saluran pernapasan atas (ISPA) meliputi infeksi pada hidung, sinus, tenggorokan, dan laring. Contoh ISPA yang umum adalah flu biasa, influenza, sinus, dan radang tenggorokan.
2. Infeksi saluran pernapasan bawah (ISPB) meliputi infeksi pada bronkus, paru-paru, dan saluran udara lainnya. Contoh ISPB yang umum adalah pneumonia, bronkitis, dan tuberkulosis.

Menurut WHO, Infeksi Saluran Pernapasan Akut merupakan salah satu penyebab kematian tersering pada anak di negara sedang berkembang. Saluran pernapasan bagian atas pada manusia adalah reservoir dari beragam komunitas komensalisme dan potensi menjadi patogen, yang diantaranya adalah *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* (pneumokokus), *Moraxella catarrhalis*, dan *Staphylococcus aureus*. Identifikasi bakteri pada saluran pernafasan secara umum dapat dilakukan dengan menggunakan sampel sputum. Sputum/dahak adalah bahan yang dikeluarkan dari paru-paru dan trakea melalui mulut.

Pemeriksaan sputum biasanya diperlukan jika diduga adanya penyakit paru. Membran

mukosa saluran pernafasan berespon terhadap inflamasi dengan meningkatkan keluaran sekresi yang sering mengandung organisme penyebab. Perhatikan dan catat volume, konsistensi, warna dan bau sputum. Pemeriksaan sputum mencakup pemeriksaan:

1. Pewarna Gram, biasanya pemeriksaan ini memberikan cukup informasi tentang organisme yang cukup untuk menegakkan diagnosa presuntif.
2. Kultur Sputum, mengidentifikasi organisme spesifik untuk menegakkan diagnosa definitif. Untuk keperluan pemeriksaan ini, sputum harus dikumpulkan sebelum dilakukan terapi antibiotik dan setelahnya untuk menentukan kemanjuran terapi.
3. Basil Tahan Asam (BTA) menentukan adanya *Mycobacterium tuberculosis* yang telah dilakukan pewarnaan bakteri ini tidak mengalami perubahan warna oleh alkohol asam

Pemeriksaan sputum diperlukan untuk menegakkan diagnosa pasien dengan penyakit:

1. Pneumonia, adalah peradangan paru yang disebabkan oleh infeksi bakteri, virus, maupun jamur. Penyebab pneumonia adalah bakteri (kebanyakan menyebabkan pneumonia pada orang dewasa), antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*.
2. Tuberkulosis, adalah penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, menyebabkan kerusakan terutama pada paru, menimbulkan gangguan berupa batuk, sesak nafas, bahkan dapat menyebar ke tulang, otak, dan organ lainnya. Bila dibiarkan, kuman ini dapat menggerogoti tubuh bahkan dapat menyebabkan kematian.
3. Legionnaires, adalah penyakit paru-paru yang disebabkan bakteri *Legionella pneumophila*. Bentuk infeksinya mirip dengan pneumonia

3.3. PROSEDUR KERJA

3.3.1. Tahap Pra Analitik

a) Persiapan Alat dan Bahan

Peralatan yang disiapkan di antaranya:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| 1. Autoclave | 9. Standar Mc Farland 0.5 |
| 2. <i>Biosafety Cabinet</i> (BSC) | 10. Pipet tetes |
| 3. Inkubator | 11. Bunsen/lampu spiritus |
| 4. Tabung Kultur dan Rak Tabung | 12. Object glass |
| 5. Jas Laboratorium | 13. Mikroskop |
| 6. Cawan petri | 14. Pinset |
| 7. Sengkelit | 15. Lampiran CLSI |
| 8. Jangka sorong | |

Bahan media dan reagen yang disiapkan di antaranya:

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1. NaCl 0,9% | 15. Cat Gram |
| 2. Alkohol 70% | 16. Oil Imersi |
| 3. Media BHI | 17. Tissue lensa |
| 4. Media BAP | 18. H ₂ O ₂ 3% |
| 5. Media MC) | 19. Kovac |
| 6. Media Uji Biokimia | 20. Disc Antibiotik Penicillin |
| 7. Media Bile Esculin | 21. Disc Antibiotik Gentamicin |
| 8. Media NA miring | 22. Disc Antibiotik Tetracyclin |
| 9. Media Karbohidrat (Gula-gula) | 23. Disc Antibiotik Ceftriaxone |
| 10. Standar Mc Farland 0,5 | 24. Disc Antibiotik Ciprofloxacin |
| 11. Media MHA | 25. Disc Optochin |
| 12. Swab steril | 26. <i>Handscoon</i> |
| 13. Oil imersi | 27. Masker |
| 14. Kertas Saring | 26. <i>Head Cap</i> |

b) Persiapan pasien

- 1) Kebersihan: Pastikan pasien dan lingkungan sekitarnya bersih.
- 2) Cuci Tangan: Instruksikan pasien dan keluarga untuk mencuci tangan secara rutin, terutama setelah batuk atau bersin.
- 3) Menutup Mulut: Ajarkan pasien untuk menutup mulut dan hidung saat batuk atau bersin dengan tisu atau siku bagian dalam.
- 4) Hindari Kontak Dekat: Hindari kontak dekat dengan orang yang sakit ISPA.
- 5) Masker: Jika pasien merasa tidak sehat atau berada di tempat ramai, gunakan masker.
- 6) Isolasi: Jika pasien dirawat di rumah sakit, lakukan isolasi yang tepat sesuai kebutuhan.
- 7) Pasien yang hendak diambil sampel untuk identifikasi sebaiknya ditelusur konsumsi antibiotik, sebaiknya tidak sedang mengkonsumsi pada saat pengambilan sampel

c) Pemberian identitas spesimen, pengambilan dan penampungan sampel

- 1) Sampel untuk identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran pernafasasn dapat berupa dahak/sputum, usap/*swab* tenggorok
- 2) Wadah yang digunakan untuk sampel harus steril, terutama untuk urin dan sputum wadahnya bermulut lebar
- 3) Pemberian identitas sampel sebaiknya diletakkan pada badan wadah, bukan pada tutup wadah sampel. Identitas sampel dapat berupa nama pasien dan nomor identifikasi (nomorurut dari rumah sakit/laboratorium) atau tanggal lahir dan sumber lain sebagai identitas pasien tersebut

- d) Penanganan dan pengiriman spesimen
- 1) Sampel pemeriksaan yang didapatkan dari layanan klinis (RS atau laboratorium klinik) bisa disimpan dalam *ice box* untuk menjaga stabilitas sampel
 - 2) Untuk sampel yang perlu didistribusikan ke lokasi uji yang jauh bisa menggunakan media transport. Untuk sampel infeksi saluran pernafasan bisa menggunakan media *Carry and Blair* yang merupakan media transport umum
 - 3) Sampel kultur darah/pus stabil selama 24 jam pada suhu 20-25°C dan dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama lebih dari 2 jam jika pemeriksaan ditunda.
 - 4) Sampel dalam media Cary and Blair stabil selama 72 jam
- e) Pengolahan dan penyiapan specimen
- 1) Sampel yang didapatkan langsung di laboratorium dapat diproses secara langsung, semisal disuburkan menggunakan media penyubur yang sesuai. Untuk sampel darah, urin dan sputum pada kasus infeksi bakteri bisa menggunakan *Brain Heart Infusion*/Kaldu pepton (diperkaya darah domba untuk bakteri Streptococci), Nutrient Broth
 - 2) Sampel sputum untuk pemeriksaan BTA bisa langsung dicat menggunakan metode ZN (Ziehl Nelson)

3.3.2. Tahap Analitik

- a) Lakukan penjaminan mutu pemeriksaan bakteriologi
- 1) Uji Sterilitas Media
 - a. Media yang telah disterilisasi, diambil secara acak beberapa kelompok media dan dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 35⁰ – 37⁰C selama 1-2 x 24 jam.
 - b. Jika setelah diinkubasi kelompok media tersebut ditumbuhi oleh lebih dari 2 koloni bakteri per cawan, maka sterilisasi dinyatakan gagal, dan media-media tersebut harus disterilkan/tidak bisa digunakan untuk pengujian
 - c. Hasil uji sterilitas media didokumentasikan
 - 2) Pengujian pH Media
 - a. Lakukan pengujian pH pada Media yang telah dibuat menggunakan pH meter
 - b. Standar acuan untuk uji kualitas pH bisa menggunakan *insert kit media* atau *product sheet* dari didistributor media (Oxoid, Merc, Liofilcem dll).
 - c. Jika pH media terlalu asam, maka ditambah dengan NaOH dan jika pH media terlalu basa maka ditambah dengan H₂SO₄ hingga diperoleh pH yang sesuai dengan ketentuan.
 - d. Evaluasi penyebab dari kondisi pH media yang tidak sesuai dengan standar (dari pelarut yang digunakan atau dari memang dari produk awal media sudah kadaluarsa dan/ mengalami kerusakan)
 - 3) Uji Kinerja/Performa Medis

- a. Siapkan suspensi bakteri standar dengan kekeruhan setara dengan standar Mc Farland 0.5 (setara dengan $1,5 \times 10^8$ cfu/ml) dan
- b. Inokulasikan sebanyak 1 mata ose ke dalam media yang menjadi target uji kinerja
- c. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika koloni bakteri tumbuh pada media tersebut, maka performa media masih bagus dan media masih dapat digunakan. Berikut merupakan beberapa daftar galur stok yang direkomendasikan untuk pemeliharaan dan penggunaan stok isolat bakteri:

Kokus Gram Positif

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 atau 33186)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Basil Gram Negatif (Enterobacteriaceae)

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain NCTC 9633

Kelompok Bakteri Gram Negatif Fastidious

- *Haemophilus influenzae* strain AMC 36-A-5 [624, NCTC 8469]

Basil Gram Negatif Lainnya/ non Enterobacteriaceae

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Vibrio cholerae*, strain ATCC 25870 dan strain 14035 (NCTC 8021)

- d. Dokumentasikan hasil uji kinerja media

3) Kontrol Kualitas Reagen

- a. Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut: setiap kali larutan/reagen kerja baru disiapkan dan setiap minggu (hal tersebut terutama untuk pewarna bakteri)
- b. Reagen harus dibuang ketika:
 - i. Telah kadaluarsa
 - ii. Tanda-tanda kerusakan yang nampak (kekeruhan, endapan, perubahan warna)
 - iii. Pemeriksaan spesimen

4) Pengujian Identifikasi Bakteri

Hari ke-1

1) Pengecatan Gram

Persiapan Apusan, cara mempersiapkan apusan yang akan diwarnai adalah:

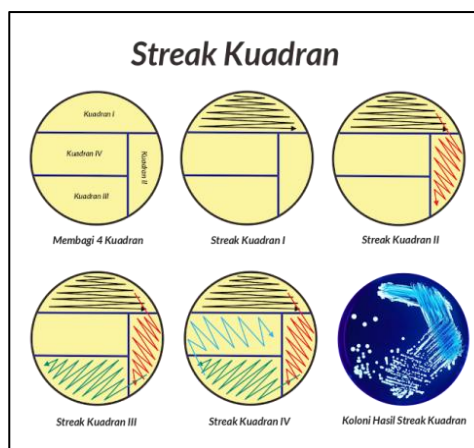
- a. Sterilkan *inoculating loop*/sengkelit/ose pada api bunsen hingga memerah, kemudian tunggu dingin selama sekitar 30 detik. Jika loop masih panas saat spesimen diambil, sel bakteri bisa rusak.
- b. Dengan menggunakan object glass bersih, letakkan spesimen di tengah object glass. Jika spesimen diambil dari agar plate, beri 1 tetes air untuk membuat suspensi terlebih

dulu.

- c. Dengan menggunakan inoculating loop, apuskan spesimen di atas object glass sampai didapatkan lapisan yang tipis, kemudian keringkan di udara.
- d. Panaskan object glass dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak 2–3 kali agar terfiksasi.

Pewarnaan Gram, dilakukan dengan cara:

- a. Tuangkan cairan pewarna kristal violet pada preparat secara merata, tunggu selama 1 menit
 - b. Miringkan preparat dan bilas dengan sedikit air mengalir
 - c. Tuangkan cairan mordant pada preparat, tunggu selama 1 menit
 - d. Miringkan kembali preparat dan bilas dengan sedikit air mengalir
 - e. Lakukan dekolorisasi dengan cara meneteskan cairan dekolorisasi sedikit demi sedikit pada preparat hingga tidak ada zat warna yang mengalir keluar dari preparat. Kemudian bilas preparat dengan air mengalir
 - f. Tuangkan *counterstain* (cat lawan/safranin) pada preparat, tunggu selama 30 detik sampai 1 menit. Kemudian bilas preparat dengan air mengalir, kemudian keringkan preparat
 - g. Lakukan pengamatan preparat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali, 400 kali, hingga 1000 kali.
- 2) Penanaman ke media isolasi untuk diferensiasi bakteri
- a. Inokulasikan sampel dari media BHI pada media isolasi secara *streak plate* (goresan), dengan prinsip penipisan sampel menggunakan ose/sengkelit supaya mendapatkan koloni yang terpisah. Media isolasi untuk diferensiasi jenis bakteri yang bisa digunakan untuk inokulasi specimen infeksi saluran pernafasan adalah MacConkey (MC) agar dan Endo Agar, Blood Agar Plate (BAP) (diperkaya darah domba khusus untuk streptococci),



Gambar 6 Inokasi Secara Streak Plate (goresan)

- b. Inkubasi media ke dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam supaya bakteri tumbuh dengan subur

Hari ke-2

1) Penanaman pada media Uji Biokimia

Koloni pada Media BAP

- a) Identifikasi koloni yang terpisah pada media isolasi *plate*
- b) Lakukan pengecatan Gram terutama pada media BAP untuk memastikan bakteri yang akan diuji lanjut adalah bakteri coccus Gram Positif
- c) Lakukan uji katalase pada media Blood Agar Plate pada koloni yang terindikasi bakteri Gram negatif coccus dengan cara: Diteteskan 1 tetes H₂O₂ 3% pada gelas objek → dengan menggunakan ose, ditambahkan koloni bakteri yang akan diuji secukupnya → dicampur hingga menjadi emulsi → hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas
- d) Inokulasikan koloni terpisah pada media BAP ke media NA miring dan uji biokimia untuk mengetahui jenis bakteri yang ada pada sampel, beberapa media uji untuk identifikasi bakteri khususnya *Streptococcus pneumonia* adalah: Bile Salt (larutan garam empedu), Bile Esculin.

Koloni pada Media MC/ENDO Agar

- e) Inokulasikan koloni terpisah pada media plate MC/ENDO ke media uji biokimia untuk mengetahui jenis bakteri yang ada pada sampel, beberapa media uji yang bisa digunakan adalah: Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Kligler Iron Agar (KIA), Sulfide Indol Motility (SIM)/ Motility Indol Ornithin (MIO), Urea, Simmon's Citrate, Media MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer), Phenil Alanin Deaminase (PAD), Media karbohidrat (Glukosa, Maltosa, Manitol, Laktosa, Sukrosa, Manosa, Arabinosa).
- f) Inkubasi media ke dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam supaya bakteri tumbuh dengan subur

Hari ke-3

- 1) Lakukan pengamatan bakteri Gram negatif pada media TSIA dan media uji biokimia, kemudian dicatat hasil ujinya. Hasil tersebut dicocokkan dengan karakteristik biokimia dari jenis bakteri suspek. Cara pembacaan hasil uji dapat dilihat pada Tabel 7 berikut:

Tabel 7**Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia**

No.	Media Uji biokimia	Interpretasi Hasil
1	Media TSIA	- Lereng : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam) - Dasar : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam) - H ₂ S (positif / negatif) - Gas (positif / negatif)
2	Media SIM	- Sulfur / H ₂ S positif (+) : terdapat warna hitam pada media - Indol positif (+) : terbentuk warna merah setelah penambahan reagen Kovac - Motility positif (+) : terjadi pertumbuhan yang menyebar keluar dari garis inokulasi, dan terjadi kekeruhan - Negatif (+) : tidak terjadi perubahan
3	Media Urea	- Positif (+) : terjadi perubahan warna pink / merah muda - Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
4	Media <i>Simmon's citrate</i>	- Positif (+) : terjadi perubahan warna biru - Negatif (-) : tetap warna hijau, tidak terjadi perubahan warna
5	Media MR	- Positif (+) : terjadi perubahan warna merah - Negatif (-) : warna kuning-jingga, tidak terjadi perubahan warna
6	Media VP	- Positif (+) : terjadi perubahan warna merah - Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
7	Media PAD	- Positif (+) : terjadi perubahan warna hijau - Negatif (-) : warna tetap kuning, tidak terjadi perubahan warna
8	Media Karbohidrat/ Gula-gula	- Positif gas (+) : tabung Durham terbentuk gelembung udara/kosong. - Positif (+) : terbentuk perubahan warna dari merah menjadi kuning (indikator <i>phenol red</i>). - Negatif (-) : tidak terjadi perubahan warna.

- 3) Lakukan pengamatan bakteri Coccus Gram Positif pada media Bile Salt dan Bile Esculin. Hasil (+) pada media Bile Salt ditandai dengan media yang jernih dikarenakan *Streptococcus pneumoniae* mampu melisis garam empedu. Sedangkan Hasil (-) atau media tidak berwarna hitam/tidak terjadi perubahan warna pada media Bile Esculin
- 4) Lakukan uji kerentanan *Streptococcus pneumonia* terhadap optochin yang dapat dikonfirmasi dengan uji sensitivitas dari kultur pada media NA miring menggunakan media BAP dengan cakram berisi optochin (suhu 37°C selama 24 jam). Tes Optochin menunjukkan hasil (+) terbentuk zona hambat dengan diameter ≥ 14 mm pada bakteri *Streptococcus pneumoniae*
- 5) Lakukan konfirmasi keberadaan kapsul seperti pada *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenzae* dapat menggunakan pengecatan kapsul metode *Burry Gins*. Pembengkakan kapsul *Streptococcus pneumonia* dapat dikonfirmasi dengan tes *Quellung* menggunakan antibodi spesifik.
- 6) Simpulkan jenis bakteri dengan melihat karakteristik sesuai dengan hasil pengujian. Berikut ini disajikan karakteristik uji bakteri pada tabel berikut.

Tabel 8

Karakteristik Uji Bakteri Bakteri Penyebab Infeksi Pernafasan

Karakteristik	Nama Bakteri			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Karakter Dasar				
Kapsul	+	+	+/- (tergantung strain)	-
Katalase	+	-	+	+
Garam sitrat	+	na	na	-
Koagulase	-	na	na	-
Flagela	-	-	-	-
Gas	+	na	-	+
Hidrolisis Gelatin	-	na	na	-
Pewarnaan Gram	-	+	-	+
H ₂ S	-	na	-	+
Hemolisis	na	alfa hemolisis	-	+ (beta lemah)
Indol	-	na	-	-
Mobilitas	-	-	-	-
MR (Metil Merah)	-	na	na	+
Oksidase	-	-	+	-
Pigmen	-	-	-	-
Bentuk	basil	diplococcus	cocobasil-batang pendek	basil/tongkat
Spora	-	-	na	-
Urea	+	-	na	-
Fermentasi				
Arabinosa	+	+	-	+
Glukosa	+	+	+	+
Laktosa	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	-
Manosa	+	na	-	+
Sukrosa	+	+	-	-
Karakteristik lain	TSIA (asam/asam)	Bile solubility (+)	Reduksi nitrat (+)	Reduksi nitrat (+)
	Voges proskauer (+)	Tes Optochin (zona \geq 14 mm)	IgA1 protease (+)	IgA1 protease (+)

Keterangan tabel 3.1 :

(+) positif terjadi reaksi

(-) negative tidak terjadi reaksi

(NA) Tidak dilakukan pengujian

4) Uji Sensitivitas Bakteri terhadap Antibiotik

Setelah jenis bakteri yang terdapat dalam spesimen teridentifikasi, selanjutnya dilakukan uji sensitivitas bakteri tersebut terhadap beberapa antibiotik. Cara ujinya menggunakan uji resistensi antibiotik metode difusi cakram (modifikasi metode Kirby-Bauer) sebagai berikut:

- a. Buat suspensi bakteri uji dengan derajat kekeruhannya di sesuaikan dengan kekeruhan Mc Farland 0.5
- b. Subkultur suspensi bakteri uji tersebut dengan menggunakan lidi kapas pada media Muller Hinton Agar (MHA), sampai seluruh permukaan MHA tertutup rapat dengan goresan,

biasanya dilakukan 4 kali goresan dan 1 kali putaran di bagian pinggir MHA, selanjutnya dibiarkan 5 menit supaya suspensi bakteri uji meresap dalam media MHA

- c. Tempelkan cakram antibiotik pada permukaan media MHA menggunakan pinset steril, dengan jarak antar cakram kurang lebih 15 mm
- d. Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam
- e. Lakukan pengukuran luas diameter zona hambat yang di bentuk oleh antibiotik menggunakan jangka sorong
- f. Komparasikan hasil pengukuran yang didapat dengan standar manual *Clinical Laboratory Standar Institute* (CLSI) M100 untuk menyimpulkan apakah bakteri Sensitif/Resisten/Intermediet terhadap antibiotik uji

5) Pengujian *Mycobaterium tuberculosis*

- a. Buatlah preparat dari sampel sputum (dahak) dengan tahapan sebagai berikut
 - i. Membersihkan kaca obyek dari kotoran dan lemak
 - ii. Menuliskan identitas pada bagian buram dengan menggunakan pensil 2B
 - iii. Membuat apusan dengan cara mengambil sputum (dahak) yang purulent menggunakan lidi pipih dan membuat ukuran 2×3 cm (oval)
 - iv. Meratakan apusan dahak dengan menggunakan lidi kecil dengan gerakan spiral (coil type) dan merata
 - v. Lidi yang telah digunakan dibuang ke dalam tempat dilapisi plastik yang berisi disinfektan
- b. Pengeringan preparat
 - i. Preparat dibiarkan di suhu kamar selama 2 menit atau sampai terlihat kering
 - ii. Jika sediaan sudah kering, tidak diperbolehkan membuat gerakan spiral kembali karena berisiko aerosol.
- c. Fiksasi
 - i. Setelah dibuat apusan spesimen dan fiksasi
 - ii. Jepit dengan menggunakan pinset
 - iii. Lewatkan sediaan di atas api bunsen biru sebanyak 2-3 kali selama 1-2 detik. Jika dipanaskan terlalu lama dapat menyebabkan sediaan rusak.
- d. Pewarnaan BTA
 - i. Genangi sediaan dengan cat ZN A (*Carbol Fuchsin*), panaskan di atas rak pengecatan dengan menggunakan api bunsen.
 - ii. Panaskan preparat sampai muncul uap dan tidak diperbolehkan sampai mendidih karena akan menimbulkan endapan kristal
 - iii. Dinginkan sekitar 5 menit

- iv. Buang sisa Carbol fuchsin, bilas dengan air mengalir. Usahakan tidak tepat di atas spesimen
- v. Genangi dengan ZN B (alkohol HCl) selama 10-20 detik, ulangi hingga warna merah pada preparat luntur sempurna
- vi. Bilas dengan air mengalir
- vii. Genangi dengan cat ZN C (*Metylene Blue*), biarkan selama 1 menit
- viii. Buang sisa cat ZN C, bilas dengan air mengalir.
- ix. Keringkan sediaan pada rak pengering
- x. Lakukan pembacaan hasil: lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x untuk menentukan fokus dan lapang pandang, kemudian, kemudian lanjutkan perhitungan jumlah BTA positif (bentuk basil panjang berwarna merah) dalam 100 lapang pandang pada perbesaran 1000x
- xi. Komparasikan hasil perhitungan sel BTA dengan skala IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) untuk menyimpulkan hasil pemeriksaan pada tabel 3.2 berikut ini.

Tabel 3.2

Interpretasi Pembacaan Sakala IUATLD

Skor	Kriteria	Cara penulisan
Negatif	Tidak ditemukan BTA pada paling sedikit 100 lapang pandang	Negatif
Scanty	Ditemukan 1-9 BTA dalam 100 lapang pandang (catat jumlah BTA yang ditemukan)	Tulis jumlah BTA yang ditemukan
1+	Ditemukan 10-99 dal 100 lapang pandang	+1
2+	Ditemukan 1-10 BTA per lapang pandang (minimal 50 lapang pandang)	+2
3+	Lebih dari 10 BTA per lapang pandang (minimal 20 lapang pandang)	+3

3.3.3. Tahap Pasca Analitik

Tahap pasca analitik meliputi kegiatan berikut ini

- 1) Dilakukan penarikan kesimpulan hasil
- 2) Dilakukan pembuatan laporan kegiatan praktikum
- 3) Meja kerja, alat dan bahan yang telah digunakan dirapikan kembali.

3.4. LAPORAN PRAKTIKUM

Identitas Sampel:

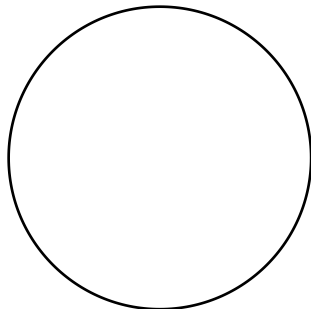
- 1) Tujuan.....
- 2) Alat dan Bahan.....

Hari I Pra Analitik – Penyuburan Sampel Tanggal.....

Hari II Tanggal

- 1) Lakukan pengecatan Gram dari media penyubur

Hasil :



Keterangan

- Bentuk :
Susunan :
Warna sel :
Sifat :

- 2) Jika didapat hasil bakteri basil gram negatif, inokulasikan sampel ke media MC
- 3) Jika didapat hasil bakteri coccus Gram Positif, inokulasikan sampel ke media BAP.
- 4) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

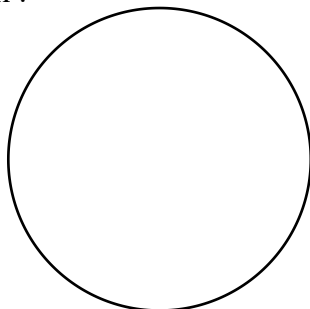
Hari III Tanggal

- 1) Amati koloni yang tumbuh pada media MC/BAP

- Bentuk :
Ukuran :
Warna koloni :
Warna media :
Elevasi :
Inti :
Ciri khas :

- 2) Inokulasikan 1 koloni bakteri yang terpisah dari media MC ke media uji biokimia (TSIA, SIM/MIO, Urea, Citrat, MR, VP, PAD, Arabinosa, Glukosa, Maltosa, Manitol, Manosa, Laktosa, dan Sukrosa) secara aseptis. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Lakukan pengecatan gram koloni yang tumbuh pada media MC/BAP

Hasil :



Keterangan

- Bentuk :
Susunan :
Warna sel :
Sifat :

3) Lakukan test katalase dari media BAP

Hasil :

4) Inokulasikan 1 koloni bakteri yang terpisah dari media BAP ke media NA miring dan MSA atau Media Bile Salt dan Bile Esculin secara aseptis. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari IV Tanggal

1) Amati hasil uji biokimia

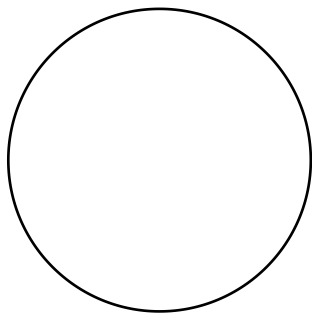
Hasil :

TSIA			SIM/MIO				Urea	Citrat	MR	VP	PAD	Ara	Glu	Mal	Man	Mno	Lak	Suk
Ferm	H ₂ S	Gas	Indol	Motil	H ₂ S	Orni												

2) Amati pertumbuhan koloni pada media NA miring.

Hasil :

3) Lakukan pengecatan gram dari media NA Miring



Keterangan

Bentuk :

Susunan :

Warna sel :

Sifat :

2) Amati pertumbuhan pada media Bile Salt (larutan garam empedu)

Hasil :

3) Amati hasil fermentasi dari media Bile Esculin

Hasil :

4) Simpulkan jenis bakteri pada sampel dengan mengkomparasikan hasil pengujian dengan tabel karakteristik bakteri.

5) Lakukan tes Optochin dengan menginokulasikan koloni bakteri dari media NA miring pada ke media BAP secara perataan dengan cakram berisi optochin

6) Setelah teridentifikasi bakteri, dilanjutkan dengan uji resistensi bakteri terhadap antibiotik metode difusi cakram (modifikasi metode Kirby-Bauer).

Hari IV Tanggal

1) Lakukan pembacaan hasil uji resistensi bakteri terhadap antibiotik metode difusi cakram (modifikasi metode Kirby-Bauer). Luas diameter zona hambat yang dibentuk oleh

antibiotik diukur menggunakan jangka sorong

Disk Antibiotik	Luas Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori* (S/I/R)
Penicillin		
Spectinomycin		
Tetracyclin		
Gentamycin		
Ciprofloxacin		
Ceftriaxone		

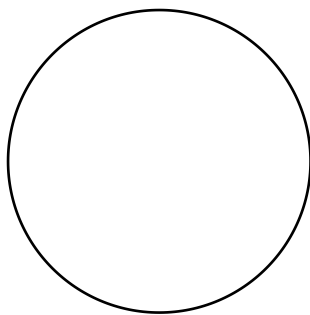
*Penentuan Kategori menggunakan acuan CLSI, S: Sensitif; I: intermediet; R: Resisten

2) Lakukan pembacaan hasil tes Optochin

Hasil :

3) Hasil pengamatan pewarnaan BTA

Hasil :



Keterangan

- Bentuk :
- Susunan :
- Warna sel :
- Sifat :

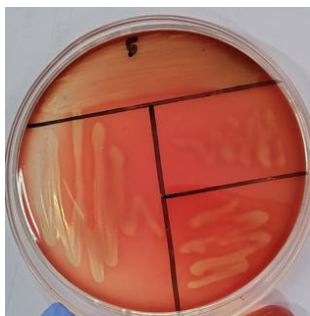
Perhitungan bakteri dengan skala IUATLD

Jumlah bakteri BTA dalam lapang pandang

- 3) Kesimpulan. Pada sampel ditemukan bakteri yang resisten/intermediet/sensitif terhadap antibiotik
- 4) Pembahasan. Pembahasan hasil kesimpulan bakteri yang ditemukan pada sampel uji, dapat berisi terkait taksonomi, penjabaran karakteristik bakteri dsb.....
.....
.....
.....
.....
- 5) Kesimpulan. Pada sampel.....yang diperiksa ditemukan bakteri BTA (+) dengan derajat IUATLD adalah

4.5. EVALUASI

- 1) Jelaskan mengapa identitas sampel sebaiknya ditulis pada badan wadah sampel dibanding pada tutupnya ?
- 2) Pada pengelolaan sampel:
 - a. Apa yang dimaksud dengan stabilitas sampel?
 - b. Apa yang perlu dilakukan supaya sampel tetap terjaga stabilitasnya?
- 3) Berapa lama waktu stabilitas sampel jika menggunakan media transport *Carry and Blair*?
- 4) Jelaskan mengapa dalam identifikasi bakteri perlu melakukan isolasi pada media plate agar dengan metode streak!
- 5) Berdasarkan hasil uji pada media berikut, sebutkan nama dan fungsi dari media?



- 6) Jelaskan bagaimana cara melakukan uji kinerja/performa media!
- 7) Bagaimana interpretasi dari hasil pengujian sterilitas media yang layak digunakan untuk identifikasi bakteri?
- 8) Hasil perhitungan preparat BTA didapat kan hasil sebanyak 150 sel BTA dalam 100 LP, bagaimanakah kesimpulan hasil pemeriksaan tersebut?
- 9) Sebutkan contoh bakteri kontrol dari kelompok gram negatif basil dan Gram Positif coccus yang umum digunakan untuk uji kualitas mutu di laboratorium bakteriologi!
- 10) Jelaskan fungsi dan cara kerja Katalase!

Tabel 10

Rubrik penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Pernafasan

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 dari 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 2 dari 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 3 dari 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 4 dari 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil identifikasi	Memenuhi 1 dari 4 kriteria berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 2 dari 4 kriteria berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 3 dari 4 kriteria berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi seluruh kriteria berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar
Hasil uji resistensi antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik

Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik 	Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik 	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kemampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan Media dan reagensia yang digunakan	Memenuhi 1 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	Memenuhi 2 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	Memenuhi 3 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	Memenuhi 4 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan	Memenuhi 1 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan 	Memenuhi 2 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan 	Memenuhi 3 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan 	Memenuhi 4 dari 4 kriteria berikut: <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan

	prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya
--	--	--	--	--

3.6. RINGKASAN

Pengujian identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran pernafasan merupakan proses untuk mengetahui bakteri dari spesimen darah, sputum dan atau urin. Proses isolasi bakteri dimulai dengan menyuburkan bakteri pada sampel di media penyubur (BHI/Kaldu pepton) dan dilanjutkan isolasi pada media agar plate dari spesimen dengan menggunakan metode streak untuk mendapatkan koloni terpisah. Setelah isolasi, identifikasi dilakukan melalui pengamatan makroskopis koloni, mikroskopis bakteri, uji biokimia, uji tambahan dan atau uji molekuler. Setelah diketahui jenis bakteri pada sampel dilakukan uji sensibilitas menggunakan metode Kirby-Bauer guna memastikan antibiotik yang sesuai untuk terapi. Hal tersebut penting untuk mengidentifikasi antibiotik yang efektif dalam terapi pasien dan mencegah peningkatan resistensi antibiotik. Zona hambat yang terbentuk dari pengujian Kirby-Bauer dikomparasikan dengan manual CLSI M100 untuk menentukan apakah bakteri sensitif/ resisten/ intermediet terhadap antibiotik uji.

3.7. GLOSARIUM

- BHI : Brain Heart Infusion
- BAP : Blood Agar Plate
- MC : Mac Conkey
- MIO : Motility Indol Ornithine
- MSA : Mannitol Salt Agar
- TSIA : Triple Sugar Iron Agar
- KIA : Kligler Iron Agar
- MHA : Mueller Hinton Agar

H₂O₂ : Hidrogen peroksida
CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute
ATCC : American Type Culture Collection
NTCC : National Type Culture Collection

3.8. DAFTAR PUSTAKA

- Aryal, S. 2025. Biochemical Test. Microbe Notes. https://microbenotes-com.translate.googleusercontent.com/translate?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=id&_x_tr_hl=id&_x_tr_pto=tc
category/biochemical-test/?
- Cappucino, J. & Welsh, C. 2017. Microbiology: A Laboratory Manual 11th edition. London: Pearson Educational Limited
- Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI). (2024). M100 Performance Standards for Antimicrobial. 30th Edition
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. (2013). Medical Microbiology, 26th Edition. McGraw Hill : USA
- Kuswiyanto. 2015. Bakteriologi 1: Buku Ajar Analisis Kesehatan. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Medlab. 2021. Pemeriksaan Nitrit Urin. <https://medlab.id/pemeriksaan-nitrit-urin/>
- MicrobeHolic. 2025. Metode Cawan Gores (Streak Plate) - Prinsip, Manfaat, Tipe dan Cara Kerja. <https://www.microbeholic.com/2022/09/metode-cawan-gores-streak-plate.html>.
- Putri, MH., Sukini & Yodong. (2017). Bahan Ajar: Mikrobiologi. Pusat Pendidikan SDM Kesehatan Kementerian Kesehatan RI
- Siregar, MT., Wulan, WS., Setiawan, D & Nuryati, A. (2018). Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik: Kendali Mutu. Pusat Pendidikan SDM Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.

BAB IV

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI UROGENITAL

4.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran urogenital.
- 2) Mahasiswa mampu melakukan penanganan spesimen klinis pada infeksi saluran urogenital.
- 3) Mahasiswa mampu menyiapkan instrumen dan bahan pemeriksaan yang dibutuhkan.
- 4) Mahasiswa mampu melakukan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran urogenital dari sampel klinis sesuai prosedur.
- 5) Mahasiswa mampu menginterpretasikan dan memverifikasi hasil pemeriksaan dengan tepat.
- 6) Mahasiswa mampu melaporkan hasil pemeriksaan dengan baik dan benar.

4.2. PENDAHULUAN

Infeksi saluran urogenital umumnya dikenal juga dengan infeksi saluran kemih (ISK) merupakan kondisi ketika organ yang terdapat di sistem perkemihan mengalami infeksi. Organ-organ tersebut diantaranya ginjal, ureter, uretra, atau kandung kemih. Berdasarkan letak infeksinya, ISK dibedakan menjadi dua, yaitu infeksi saluran kemih atas yang meliputi parenkim ginjal dan ureter, dan infeksi saluran kemih bawah meliputi infeksi kandung kemih, urethra, dan pada laki-laki infeksi prostat.

ISK ditandai dengan beberapa gejala diantaranya adalah keinginan buang air kecil secara terus-menerus, adanya sensasi terbakar saat buang air kecil, nyeri pinggang, nyeri suprapubik, berkemih dengan jumlah urin sedikit, urin berwarna merah dan berbau tajam. ISK biasanya ditandai dengan keberadaan mikroorganisme di dalam urin. Beberapa mikroorganisme penyebab ISK diantaranya *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Enterococci*, *Klebsiella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas spp.* Ketepatan diagnosis penyakit ISK bergantung kepada gejala klinis, uji urinalisis, dan kultur urin.

E. coli merupakan bakteri Gram-negatif, berbentuk basil lurus, tidak berspora, ada yang berkapsul, sebagian dapat bergerak aktif dengan flagel peritrik, memfermentasi laktosa dan manitol. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 10 ° -40 ° C dengan suhu optimal 37,5 ° C. *E.coli* memiliki faktor virulensi berupa fimbrae (P fimbrae dan tipe-1 fimbrae) yang bersifat

spesifik berikatan dengan sel uroepitelial, hal tersebut meningkatkan patogenitas bakteri untuk menginvasi dan menginfeksi saluran kemih. *E.coli* pada saluran kemih dikenal dengan *E.coli* uropatogenik (UPEC). *E.coli* tidak mengakibatkan komplikasi, namun dapat menyebabkan kekambuhan selama 12 bulan setelah infeksi tersebut sembuh. Gejala yang dialami pada ISK yang disebabkan oleh *E.coli* adalah nyeri perut atau panggul, rasa terbakar saat buang air kecil, kebutuhan mendesak untuk buang air kecil lebih sering, urin keruh dan berbau busuk.

P. mirabilis merupakan bakteri Gram negatif berbentuk basil pendek, anaerob fakultatif, bersifat motil, memiliki flagella peritrikus, fermentatif glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, memproduksi H₂S, oksidase negatif, dan tes katalase positif. Bakteri ini memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi sel *swarmer* ketika dikultur pada media non-inhibitor. Bakteri ini dapat tumbuh secara optimal pada suhu 37 ° C. *P. mirabilis* adalah salah satu bakteri patogen nosokomial yang sering menyebabkan infeksi saluran kemih, terutama pada pasien yang menjalani kateterisasi jangka panjang. Beberapa gejala infeksi Proteus mencakup nyeri panggul, hematuria, dan urin yang terus bersifat basa. Kristalisasi kalsium dan magnesium dalam urin dengan pH basa menyumbat lumen kateter (pembentukan biofilm) dan menyebabkan retensi urin akut, serta berkembangnya bakteriuria dan infeksi lainnya, sehingga menyebabkan pielonefritis, bakteremia, dan syok. Faktor risiko ISK yang berkaitan dengan *P. mirabilis* meliputi aktivitas seksual, hubungan anal tanpa pengaman, penis yang tidak disunat, atau defisiensi imun.

P. aeruginosa adalah bakteri Gram negatif, berbentuk basil lurus atau lengkung, tidak berspora, dan mempunyai flagela monotrikus sehingga selalu bergerak. Dapat ditemukan satu-satu, berpasangan, kadang-kadang mempunyai rantai pendek. Bakteri ini tumbuh baik pada suhu 37°-42°C. *P. aeruginosa* tergolong oksidase-positif, *non-fermenter*, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa. Spesies ini menghasilkan satu atau lebih pigmen yang dihasilkan dari satu asam amino aromatik seperti tirosin dan fenilalanin. Beberapa pigmen tersebut antara lain *piosianin* (warna biru), *pioverdine* (warna kuning), *piorubin* (warna merah), dan piomelanin (warna coklat). *P. aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik yang sering diisolasi pada ISK yang menyerang pasien lanjut usia dan pasien yang menggunakan kateter dan dikaitkan dengan pengobatan antibiotik yang tidak efektif dan hasil klinis yang buruk.

4. 3. PROSEDUR KERJA

4.3.1. Tahap Pra Analitik

Proses mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri patogen *E. coli*, *P. mirabilis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* yang terdapat pada sampel klinis diperlukan spesimen yaitu urin dari pasien infeksi saluran urogenital. Berikut tahapan pra analitik:

a) Persiapan alat dan bahan :

Alat :

- 1) Mikroskop
- 2) *Object glass*
- 3) Cawan petri
- 4) Tabung reaksi
- 5) Pipet tetes
- 6) Ose bulat
- 7) Ose jarum
- 8) Basil pengaduk "L"
- 9) Lampu spiritus
- 10) Korek api
- 11) Jangka sorong
- 12) Inkubator
- 13) Rak tabung
- 14) Rak pewarnaan

Bahan :

- 1) Media isolasi : BAP, MC
- 2) Media selektif : EMBA, *Cetrimide Agar*
- 3) Media identifikasi : media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), TSIA, MR-VP, SIM, PAD, Urea, *Simmon's citrate*
- 4) Media uji sensitivitas : media MHA
- 5) Disk antibiotik
- 6) Strip test oksidase
- 7) NaCl 0,85% steril
- 8) Standar *McFarland 0,5*
- 9) Pewarnaan Gram
- 10) Reagen uji biokimia : Methyl red, α -naftol 5%, KOH 40%, FeCl₃ 10%, Kovac's / Ehrlich's. Kovac's mengandung p-dimethylaminobenzaldehyde HCl pekat dan amilalkohol yang sifatnya non polar, sedangkan Ehrlich's mengandung p-dimethylaminobenzaldehyde HCL pekat dan etanol yang bersifat polar.

Spesimen ; sampel klinis berupa urin

b) Persiapan Pasien

Sebaiknya pengambilan urin dilakukan sebelum pemberian antibiotik atau 48-72 jam

setelah pemberian antibiotik terakhir. Disarankan urin pagi pertama (pada malam hari tidak buang air kecil). Bila hal ini tidak memungkinkan, maka urin diambil 2 jam setelah buang air kecil terakhir.

c) Pemberian Identitas spesimen

- 1) Spesimen harus diberi label yang berisi:
 - a. Nama pasien.
 - b. Nomor identifikasi (nomor urut dari rumah sakit/laboratorium) atau tanggal lahir dan sumber lain sebagai identitas pasien tersebut.
- 2) Informasi yang dicantumkan pada label harus jelas dan bisa dicocokkan dengan formulir permintaan ketika diterima di laboratorium.

d) Pengambilan Spesimen Urin porsi tengah

Pada Wanita :

- 1) Pasien sebaiknya mencuci tangan dengan sabun dan air, lalu dibilas dan dikeringkan dengan handuk / tisu.
- 2) Melebarkan labia dengan satu tangan, kemudian membersihkan labia dan vulva menggunakan sabun cair / kasa steril dari arah depan ke arah belakang.
- 3) Bilas area tersebut dengan air, dan keringkan dengan kasa steril / tisu.
- 4) Selama proses berlangsung, labia harus tetap terbuka lebar dan jari tangan tidak boleh menyentuh daerah yang sudah dibersihkan.
- 5) Biarkan urin keluar beberapa cc, selanjutnya tampung urin pancaran tengah ke dalam wadah steril bertutup ulir. Pengumpulan urin selesai sebelum aliran urin tersebut habis.
- 6) Wadah ditutup rapat dan segera dikirim ke laboratorium.

Pada Laki-laki :

- 1) Pasien sebaiknya mencuci tangan dengan sabun dan air, lalu dibilas sebelum melakukan pengambilan urin.
- 2) Bersihkan penis dengan sabun cair, jika tidak disirkumsisi tarik *foreskin* (kulit bagian depan) terlebih dahulu, dan cuci dengan sabun cair.
- 3) Bilas area tersebut dengan air.
- 4) Jaga *foreskin* tetap tertarik, biarkan urin keluar beberapa cc. Hindari urin mengenai lapisan tepi wadah.
- 5) Tampung urin porsi tengah dalam wadah steril.
- 6) Wadah ditutup rapat dan segera dikirim ke laboratorium.

Pada kateter (yang telah terpasang) :

- 1) Klem bagian distal kateter (\pm 5 cm dari *port*).

- 2) Bersihkan area kateter yang akan di-pungsi (proksimal dari klem) menggunakan alkohol 70%.
- 3) Secara aseptis, punksi urin dengan spuit pada area tersebut ke arah proksimal, diambil \pm 10 ml.
- 4) Tempatkan sampel urin dalam wadah steril.
- 5) Khusus untuk bayi, menggunakan urin *collector*.
- 6) Spesimen segera dikirimkan ke laboratorium.

Pada aspirasi suprapubik

- 1) Dilakukan desinfeksi kulit di daerah suprapubik dengan Povidone Iodine 10%, kemudian bersihkan sisa Povidone Iodine dengan kapas alkohol 70%.
- 2) Urin diaspirasi tepat di titik suprapubik menggunakan spuit, diambil \pm 20 ml dengan cara aseptik.
- 3) Urin dimasukkan ke dalam wadah steril dan tertutup rapat.
- 4) Spesimen dikirimkan ke laboratorium.

e) Penyimpanan Spesimen

- 1) Semua spesimen urin harus sudah sampai di laboratorium kurang dari 2 jam setelah pengambilan.
- 2) Jika hal tersebut tidak memungkinkan, spesimen harus disimpan di lemari es ($2-8^{\circ}\text{C}$) segera setelah pengambilan, selanjutnya harus sudah diproses di laboratorium dalam waktu 24 jam.
- 3) Bila terjadi keterlambatan pengiriman (lebih dari 24 jam), spesimen urin harus disimpan dalam tabung yang sudah dipreservasi dengan 0,5 ml *Boric Acid Glycerol*.

f) Pengiriman Spesimen

Pengiriman spesimen dilakukan dengan menggunakan *coolbox* ($2-8^{\circ}\text{C}$), kecuali jika waktu perjalanan yang dibutuhkan untuk pengiriman kurang dari 2 jam.

4.3.2. Tahap Analitik

Hari Pertama :

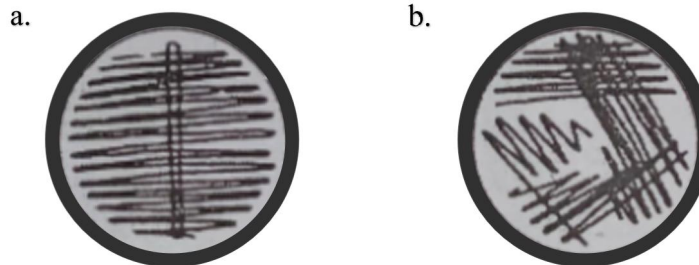
- 1) Penanaman pada media isolasi
 - a. Siapkan alat dan bahan.
 - b. Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu dibiarkan dingin.
 - c. Lakukan isolasi pada media BAP dan MC. Isolasi ini bisa dilakukan dengan 2 cara yaitu:

Cara I : Langsung

- i. Ambil masing-masing sebanyak 1 ose (10^{-3}) sampel urin.
- ii. Untuk media BAP : goreskan pada bagian tengah media, dan

selanjutnya buat goresan zig-zag di sepanjang goresan pertama dengan arah tegak lurus sampai media tergores merata hingga akhir.

- iii. Untuk media MC : buat goresaan secara kuadran.
- iv. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- v. Hitung koloni yang tumbuh pada media BAP.



Gambar 7 Teknik inokulasi spesimen urin, (a) pada media BAP;
(b) pada media MC

Cara II : Pengenceran

- i. Buat pengenceran urin, dengan cara mencampurkan 0,2 ml urin dengan 9,8 ml NaCl 0,85% steril.
- ii. Ambil masing-masing sebanyak 50 µl urin yang telah diencerkan kemudian teteskan pada media BA dan MC.
- iii. Kemudian ratakan menggunakan ose atau basil pengaduk “L” sampai rata.
- iv. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- v. Hitung koloni yang tumbuh pada media BAP.

*setelah selesai ose bulat dipanaskan kembali tersebut sampai membara.

2) Pewarnaan Gram



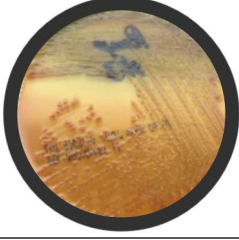
- a. Siapkan alat dan bahan.
- b. Ambil 1 tetes NaCl 0,85% dan letakkan pada *object glass*.
- c. Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu biarkan dingin.
- d. Ambil sebanyak 1 ose sampel urin dan campurkan dengan NaCl 0,85%, lalu buat sediaan.
- e. Panaskan kembali ose bulat sampai membara, dan biarkan dingin.
- f. Keringkan sediaan dan fiksasi dengan melewati *gelas objek* di atas api bunsen sebanyak 3x.
- g. Teteskan Gram I (gentian violet) pada sediaan selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- h. Teteskan Gram II (lugol) selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- i. Teteskan Gram III (alkohol) selama 30 detik, lalu bilas dengan air mengalir.

- j. Teteskan Gram IV (safranin) selama 1-2 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- k. Keringkan sediaan dengan meletakkan di posisi tegak atau menggunakan tisu.
- l. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x menggunakan minyak imersi, meliputi morfologi bentuk koloni, warna, susunan, dan sifat bakterinya.
- m. Interpretasi hasil :
 - i. Bakteri Gram-positif akan berwarna ungu
 - ii. Bakteri Gram-negatif akan berwarna merah.

Hari Kedua :

- 1) Pengamatan koloni dan pembacaan hitung koloni pada media isolasi
 - a. Siapkan alat dan bahan.
 - b. Amati pertumbuhan koloni bakteri pada media BAP dan MC. Jika pada saat pengamatan pertumbuhan bakteri hanya terjadi pada media BAP, lakukan identifikasi lanjutan menggunakan media identifikasi untuk bakteri Gram (+). Jika pada kedua media isolasi (BAP dan MC) terjadi pertumbuhan, lakukan identifikasi lanjutan menggunakan media identifikasi untuk bakteri Gram (-).
 - c. Interpretasi hasil koloni yang tumbuh pada media MC:

Tabel 10
Karakteristik Koloni pada Media MC

Spesies	Pertumbuhan Koloni pada Media MC	Gambar
<i>Escherichia coli</i>	Koloni sedang, berwarna merah pink, <i>smooth</i> , memfermentasi laktosa.	
<i>Proteus mirabilis</i>	Koloni sedang, jernih, <i>smooth</i> , tidak memfermentasi laktosa.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Koloni sedang, jernih, <i>smooth</i> , sedikit kehijauan, tepinya tidak rata, tidak memfermentasi laktosa.	

- d. Lakukan pembacaan hitung koloni yang tumbuh pada media BAP dengan cara sebagai berikut :
- i. Cara I : jumlah bakteri dalam 1 ml urin adalah koloni yang tumbuh dikalikan 1000.
 - ii. Cara II : Jumlah bakteri dalam 50 ml urin adalah Y koloni yang tumbuh dikalikan dengan pengenceran 50 X. Dengan demikian, jumlah bakteri dalam 1 ml urin = 50 Y.
- 3) Interpretasi hasil perhitungan koloni :

Tabel 11
Interpretasi Hasil Perhitungan Koloni pada Kultur Urin

Kategori	Interpretasi Hasil
I	Jika didapatkan jumlah bakteri kurang dari 10^4 per ml urin : <ul style="list-style-type: none"> - Untuk urin porsi tengah : diinterpretasikan kemungkinan tidak ada infeksi saluran kemih. - Untuk urin aspirasi suprapubik atau kateter : pemeriksaan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi serta uji sensitivitas.
II	<ul style="list-style-type: none"> - Jika jumlah bakteri antara 10^4-10^5 per ml urin dan pasien tidak menunjukkan gejala, lakukan pemeriksaan urin kedua dan perhitungan bakteri ulang. - Jika pasien menunjukkan gejala ISK, pemeriksaan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi serta uji sensitivitas.
III	Pada urin porsi tengah, jika jumlah bakteri lebih dari 10^5 per ml urin, maka pemeriksaan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi serta uji sensitivitas. Kategori ini tidak berlaku untuk urin aspirasi suprapubik dan kateter.

- 4) Penanaman pada media selektif dan media identifikasi
- a. Siapkan alat dan bahan.
 - b. Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu biarkan dingin.
 - c. Lakukan penanaman ke media selektif yaitu media EMBA untuk *.coli*, dan media *Cetrimide Agar* untuk *P.aeruginosa*.
 - d. Lakukan penanaman ke media identifikasi secara berturut-turut yaitu :
 - i. Media cair meliputi media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), dan media MR-VP. Ambil sebanyak 1 ose bulat koloni, lalu celupkan ke media tersebut secara berturut-turut tanpa mengambil koloni secara berulang dan selanjutnya homogenkan.
 - ii. Media semi solid yaitu media SIM. Ambil sebanyak 1 ose jarum koloni, lalu tusukkan ose hingga ke dasar tabung.
 - iii. Media padat meliputi media *Simmon's citrate*, media Urea, media PAD, dan media TSIA. Koloni yang ada ose jarum yang digunakan dari media semi solid tadi, selanjutnya goreskan secara zig-zag pada media padat, tanpa mengambil koloni ulang.

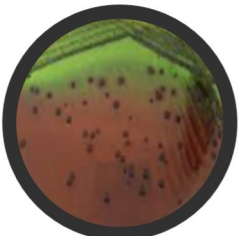

Khusus untuk TSIA setelah digoreskan, lakukan penusukan dengan ose hingga ke dasar tabung.

- e. Panaskan kembali ose bulat dan ose jarum tersebut sampai membara.
- f. Selanjutnya inkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Ketiga :

- 1) Pengamatan pertumbuhan koloni pada media identifikasi dan reaksi uji biokimia.
 - a. Siapkan alat dan bahan.
 - b. Amati pertumbuhan dan ciri khas koloni bakteri pada media selektif dan media identifikasi.
 - c. Lakukan penambahan reagen pada beberapa media sebagai berikut :
 - i. MR : tambahkan larutan Methyl Red
 - ii. VP : tambahkan larutan α -naftol 5% dan KOH 40%
 - iii. SIM : tambahkan larutan Kovac's / Ehrlich's
 - iv. PAD : tambahkan larutan FeCl_3 10%
 - d. Khusus *P. aeruginosa*, lakukan uji oksidase, dengan cara mengambil 1 ose bulat dari media agar atau media cair, kemudian oleskan ke bagian strip yang dilapisi reagen oksidase secara merata, kemudian amati perubahan warna setelah 10-30 detik.
- 2) Interpretasi Hasil

Tabel 12
Karakteristik Koloni pada Media Selektif

No.	Media Selektif	Interpretasi Hasil	Gambar
1	Media EMBA	<i>Escherichia coli</i> : Koloni sedang, <i>smooth</i> , keping, kehijauan-hitam metalik.	
2	Media <i>Cetrimide Agar</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Koloni sedang, <i>smooth</i> , hijau kebiruan	

Tabel 13**Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia**

No.	Media Identifikasi	Interpretasi Hasil
1	Media Gula-gula	<ul style="list-style-type: none">- Positif gas (+) : terbentuk perubahan warna dari merah menjadi kuning (indikator <i>phenol red</i>) dan di dalam tabung Durham terbentuk gelembung udara.- Positif (+) : terbentuk perubahan warna dari merah menjadi kuning (indikator <i>phenol red</i>).- Negatif (-) : tidak terjadi perubahan warna.
2	Media MR	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna merah- Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
3	Media VP	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna merah- Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
4	Media SIM	<ul style="list-style-type: none">- Sulfur / H₂S positif (+) : terdapat endapan hitam pada media- Indol positif (+) : terbentuk cincin berwarna merah- Motility positif (+) : terjadi pertumbuhan yang menyebar keluar dari garis inokulasi, dan terjadi kekeruhan- Negatif (+) : tidak terjadi perubahan
5	Media <i>Simmon's citrate</i>	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna biru- Negatif (-) : tetap warna hijau, tidak terjadi perubahan warna
6	Media Urea	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna pink / merah muda- Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
7	Media PAD	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna hijau- Negatif (-) : warna tetap kuning, tidak terjadi perubahan warna
8	Media TSIA	<ul style="list-style-type: none">- Lereng : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam)- Dasar : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam)- H₂S (positif / negatif)- Gas (positif / negatif)
9	Oksidase Test	<ul style="list-style-type: none">- Positif (+) : terjadi perubahan warna biru atau ungu pada strip- Negatif (-) : tidak terjadi perubahan warna

3) Uji Sensitivitas Antibiotik

- 1) Setelah jenis bakteri yang terdapat dalam spesimen teridentifikasi, selanjutnya lakukan uji sensitivitas bakteri tersebut terhadap beberapa antibiotik.
- 2) Cara ujinya menggunakan uji resistensi antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer) sebagai berikut:
 - a. Buat suspensi bakteri uji dengan derajat kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan Mc Farland 0.5
 - b. Subkultur suspensi bakteri uji tersebut dengan menggunakan lidi kapas pada media MHA, sampai seluruh permukaan MHA tertutup rapat dengan goresan, biasanya dilakukan 4 kali goresan dan 1 kali putaran di bagian pinggir MHA, selanjutnya dibiarkan 5 menit supaya suspensi bakteri uji meresap dalam media MHA
 - c. Tempelkan disk antibiotik pada permukaan media MHA menggunakan pinset steril,

- dengan jarak antar disk kurang lebih 15 mm.
- d. Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
 - e. Pengukuran luas diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik menggunakan jangka sorong.
 - f. Catat diameter zona hambatan yang terbentuk, dan dibandingkan dengan tabel standar manual CLSI. Pelaporan hasil adalah sensitif, intermediate, atau resisten.

4.3.3 Tahap Pasca Analitik

1) Pelaporan Hasil

Setelah hasil identifikasi ditemukan secara lengkap dengan spesiesnya, dilakukan pencatatan atau pelaporan hasil pemeriksaan, kemudian menarik kesimpulan berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi, serta uji sensitivitas antibiotik. Hasil yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan tabel standar isolasi dan identifikasi. Berikut ini disajikan Tabel 4.5 Standar Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Tabel 14
Standar Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri

No.	Spesies	Glu	Lac	Suc	Mal	Man	MR	VP	SIM	SC	Urea	PAD	TSIA
1	<i>E.coli</i>	+g	+	+	+	+	+	-	-/+	-	+	-	A/A/+/-
2	<i>P.mirabilis</i>	+g	-	-	-	-	+	-	+/-	+	+	+	K/A/+/+
3	<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	-	-	K/K/-/-
		Oksidase : +											

2) Sumber Kesalahan Pemeriksaan

Sumber kesalahan yang kemungkinan dapat ditemukan selama tahapan identifikasi adalah sebagai berikut :

- a. Spesimen tidak disimpan atau dikirim sesuai suhu yang dianjurkan (suhu kamar atau pendingin tergantung permintaan).
- b. Pengambilan spesimen tidak sesuai waktu ideal (misalnya, setelah terapi antibiotik dimulai).
- c. Kesalahan inokulasi media (jumlah inokulum terlalu banyak atau terlalu sedikit).
- d. Kontaminasi silang sampel.
- e. Penulisan atau pelaporan salah nama spesies atau hasil uji sensitivitas antibiotik.
- f. Penggunaan singkatan yang tidak jelas atau berbeda interpretasi.

3) Jaminan Mutu Pemeriksaan

a. Perawatan Peralatan

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan laboratorium adalah peralatan laboratorium, sehingga haruslah dirawat dengan baik, serta selalu di kalibrasi.

Tabel 15
Kendali Mutu Peralatan di Laboratorium

Peralatan	Perawatan Rutin	Pemantauan	Pemeliharaan dan Inspeksi Teknis
<i>Autoclave</i>	Bersihkan dan ganti air setiap bulan	<ul style="list-style-type: none"> - Periksa dan sesuaikan tinggi air sebelum setiap penggunaan. - Catat waktu dan suhu atau tekanan setiap kali digunakan. - Catat kinerja dengan carik spora setiap minggu. 	Setiap 6 bulan
Oven	Bersihkan bagian dalamnya setiap bulan	Catat waktu dan suhu setiap penggunaan	Setiap 6 bulan
Inkubator	Bersihkan dinding-dinding dalam dan rak-raknya setiap bulan	Catat suhu pada setiap permulaan hari kerja (yang diperbolehkan $35\pm 1^{\circ}\text{C}$).	Setiap tahun
Mikroskop	Lap lensa dengan kertas tisu atau kertas lensa setiap akhir hari kerja. Bersihkan dan lumasi alas mekanik setiap minggu. Lindungi dengan sarung jika tidak digunakan.	<ul style="list-style-type: none"> - Periksa kesejajaran kondensor setiap bulan. - Tempatkan cakram silica biru di bawah sarung mikroskop untuk mencegah pertumbuhan jamur pada udara lembab 	Setiap tahun

b. Media Biakan

- 1) Uji kualitas media mencakup aspek yang luas, baik media buatan sendiri maupun media jadi, oleh karena itu penyiapan media harus mendapat perhatian. Sebelum digunakan harus dilakukan uji kualitas media.

a. Pengujian pH Media

Media yang telah dibuat dilakukan pengujian pH. Jika pH media terlalu asam, maka ditambah dengan NaOH dan jika pH media terlalu basa maka ditambah dengan H₂SO₄ hingga diperoleh pH yang sesuai dengan ketentuan.

b. Uji Sterilitas Media

- i. Media yang telah di sterilisasi, diambil secara acak beberapa kelompok media dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu $35^{\circ} - 37^{\circ}\text{C}$ selama 1-2 x

24 jam.

- ii. Jika setelah diinkubasi kelompok media tersebut ditumbuhi oleh lebih dari 2 koloni bakteri per cawan, maka sterilisasi dinyatakan gagal, dan media-media tersebut harus dibuang semua.
 - iii. Hasil uji sterilitas media disimpan.
- 2) Penanaman bakteri kontrol positif dan kontrol negatif

Tabel 16

Uji Media Perbenihan dan Kultur Menggunakan Kontrol CLSI

Media	Inkubasi	Organisme Kontrol	Hasil yang diharapkan
MC	24 jam aerob	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Koloni merah pink
		<i>P.mirabilis</i> (ATCC 29906)	Koloni tak berwarna
MR	48 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Positif
		<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	Negatif
MHA	24 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922) <i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Diameter zona yang dapat diterima lihat CLSI
PAD	24 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Negatif
		<i>P.mirabilis</i> (ATCC 29906)	Positif
SC	48 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Tidak tumbuh
		<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	Biru

3) Pengujian kualitas reagensia

Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut:

- a. Pengujian kualitas reagen seperti zat pewarna bakteri dapat dilakukan setiap kali pembuatan larutan/reagen kerja yang baru, serta berkala secara mingguan.
- b. Cat / reagensia dapat dibuang atau tidak dipakai ketika tanggal kadaluarsanya telah melampaui batas, atau jika ditemukan adanya perubahan warna, kekeruhan, dan adanya endapan.

Hari Pertama

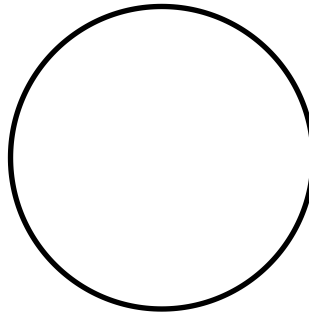
Pewarnaan Gram

Warna :

Bentuk :

Susunan :

Sifat :



Hari Kedua

Pembacaan Koloni pada Media Isolasi

Media MC

Bentuk :

Ukuran :

Warna :

Tepi :

Elevasi :

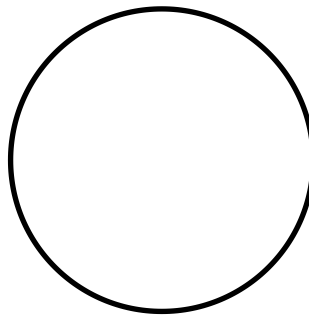
Konsistensi :

Fermentasi laktosa :

Perhitungan koloni

Media BAP

Jumlah koloni :



Hari Ketiga

Pembacaan Koloni pada Media Selektif

Media EMBA

Bentuk :

Ukuran :

Warna :

Tepi :

Elevasi :

Konsistensi :

Fermentasi laktosa :

Media *Cetrimide Agar*

Bentuk :

Ukuran :

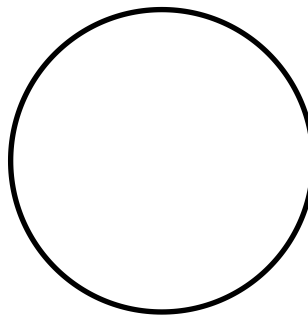
Warna :

Tepi :

Elevasi :

Konsistensi :

Fermentasi laktosa :



Pembacaan Hasil Identifikasi

Media Identifikasi dan Biokimia	Hasil
Media gula-gula	
Media TSIA	
Media MR	
Media VP	
Media SIM	
Media SC	
Media Urea	
Media PAD	

Hari Keempat

Pembacaan Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik

Disk Antibiotik	Luas diameter zona hambat (mm)	Kategori* (S/I/R)

*Penentuan kategori berdasarkan standar CLSI : S – Sensitif, I – Intermediet, R - Resisten

Kesimpulan :

Pembahasan :

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

4.5. EVALUASI

- 1) Kapankah metode pengenceran urin perlu untuk dilakukan?
- 2) Mengapa hasil pemeriksaan bakteriologis urin perlu disertai dengan hasil pemeriksaan sedimen urin?
- 3) Jelaskan aturan perhitungan hasil kultur urin untuk membedakannya dengan kemungkinan kontaminasi!

Tabel 17

Rubrik Penilaian Praktikum Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Urogenital

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil identifikasi	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi saluran urogenital 4. Melakukan penarikan kesimpulan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi saluran urogenital 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi penyebab infeksi saluran urogenital 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi saluran urogenital 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi

	identifikasi dengan benar			dengan benar
Hasil uji resistensi antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut : 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 3. Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. 4. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat.	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut : 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 3. Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. 4. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat.	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut : 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 3. Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. 4. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat.	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut : 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 3. Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. 4. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat.

Afektif (Attitude)

Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik

Kognitif (Kamampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)

Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel

	<p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran urogenital</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi saluran urogenital</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>bakteri penyebab infeksi saluran urogenital</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>dengan benar</p> <p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi urogenital</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>
--	---	--	--	---

4.6. RINGKASAN

Infeksi saluran urogenital umumnya dikenal juga dengan infeksi saluran kemih (ISK) merupakan kondisi ketika organ yang terdapat di sistem perkemihan mengalami infeksi. ISK biasanya ditandai dengan keberadaan mikroorganisme di dalam urin. Beberapa mikroorganisme penyebab ISK diantaranya *E. coli*, *S. saprophyticus*, *P. mirabilis*, Enterococci, *Klebsiella* spp., *P. vulgaris*, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas* spp. Ketepatan diagnosis penyakit ISK bergantung pada gejala klinis, uji urinalisis, dan kultur urin. ATLM penting untuk mengetahui prosedur yang sesuai dalam identifikasi bakteri karena kesalahan pemilihan metode atau prosedur pengujian kultur dan uji resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat menyebabkan terjadinya kesalahan diagnosis dan terapi.

4.7. GLOSARIUM

ATCC	:	<i>American Type Culture Collection</i>
BAP	:	<i>Blood Agar Plate</i>
CLSI	:	<i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>
EMBA	:	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
FeCl ₃	:	<i>Ferric chloride</i>
H ₂ S	:	Hidrogen Sulfida
KOH	:	Kalium Hidroksida
MC	:	<i>Mac Conkey</i>

MHA	:	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MR	:	<i>Methyl Red</i>
PAD	:	<i>Phenylalanine Deaminase</i>
SC	:	<i>Simmon's citrate</i>
SIM	:	<i>Sulfide Indole Motility</i>
TSIA	:	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
VP	:	<i>Voges Proskauer</i>

4.8. DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, F. G., Butel, J.S, and Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Salemba Medika.
- Delost, M.D. 2018. *Mikrobiologi Diagnostik untuk Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. 2019. *Buku Ajar Pemeriksaan Mikrobiologi Pada Penyakit Infeksi*. Jakarta : CV. Sagung Seto.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Prosedur Pemeriksaan Bakteriologi Klinik*. Jakarta : Kemenkes RI.
- Kurniawan, F.B. & Sahli, I.T. 2017. *Bakteriologi : Praktikum Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kuswiyanto. 2016. *Bakteriologi 2 : Buku Ajar Analisis Kesehatan*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Leboffe, M.J. & Pierce, E.B. 2011. *A Photographic for The Microbiology Laboratory*, 4th Edition. USA : Morton Publisher Company.
- Soemarno. 2000. *Identifikasi Bakteriologi Klinik*. Yogyakarta : Akademi Analisis Kesehatan.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2019. *Microbiology : An Introduction*, Thirteenth Edition. Boston : Pearson.
- Utami, P.R. & Indrayati, S. 2023. *Buku Ajar Pengantar Bakteriologi Dasar Untuk ATLM*. Sleman : Penerbit Deepublish

BAB V

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL

5.1 TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran dari topik ini adalah :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial.
- 2) Mahasiswa mampu melakukan penanganan spesimen klinis pada infeksi saluran nosokomial.
- 3) Mahasiswa mampu menyiapkan instrumen dan bahan pemeriksaan yang dibutuhkan.
- 4) Mahasiswa mampu melakukan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial dari sampel klinis sesuai prosedur.
- 5) Mahasiswa mampu menginterpretasikan dan memverifikasi hasil pemeriksaan dengan tepat.
- 6) Mahasiswa mampu melaporkan hasil pemeriksaan dengan baik dan benar.

5.2 PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi pada pasien yang menjalani perawatan di rumah sakit dan muncul lebih dari 48-72 jam pasca perawatan. Infeksi ini bisa terjadi karena adanya kontaminasi dari fasilitas kesehatan yang terkontaminasi bakteri patogen. Infeksi nosokomial biasanya menyerang pasien yang berada pada kondisi *immunocompromized*, dan yang paling sering terkena infeksi ini adalah pasien yang berada pada ruang perawatan *Intensive Care Unit (ICU)*.

Acinetobacter sp. dikaitkan dengan infeksi nosokomial dan oportunistik. Bakteri ini membentuk koloni di area-area kulit yang lembab dan dalam keadaan normal ditemukan pada vagina dan saluran cerna. Organisme ini juga ditemukan di lingkungan rumah sakit, tanah, dan air. Infeksi ini mencakup infeksi saluran kemih dan infeksi saluran napas, infeksi pada luka yang dikaitkan dengan kontaminasi bakteri.

Acinetobacter baumannii merupakan flora normal pada manusia yang ada pada kulit, mukosa faring, dan sekret dari traktur respiratorius. Bakteri ini juga merupakan penyebab terbanyak dari infeksi lokal serta sistemik, meliputi pneumonia, septikemia, dan infeksi pada luka. Pada lingkungan rumah sakit, khususnya di ruang perawatan ICU, bakteri ini ditemukan pada peralatan kesehatan yang digunakan berkali-kali seperti tabung untuk intubasi, alat untuk mengukur tekanan arteri, *humidifiers*, wastafel, dan respirometer karena sifat bakteri yang dapat bertahan dalam keadaan kering pada waktu yang lama. Selain itu, bakteri ini juga dapat ditemukan pada kondisi lembab seperti pada tenaga kesehatan, tempat tidur yang ada di ruang ICU, dan ventilator. *A. baumannii* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk kokobasil, aerob, dan non-motil, katalase positif, oksidase negatif, dan tidak memfermentasi laktosa. Spesies ini bisa diisolasi dari spesimen

berupa darah, urin, dan dahak.

5.3 PROSEDUR KERJA

5.3.1 Tahap Pra Analitik

Tujuan tahap ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri patogen *Acinetobacter baumannii* yang terdapat pada sampel klinis dari pasien dengan infeksi nosokomial.

a) Alat dan bahan :

Alat

- 1) Mikroskop
- 2) *Object glass*
- 3) Cawan petri
- 4) Tabung reaksi
- 5) Pipet tetes
- 6) Ose bulat
- 7) Ose jarum
- 8) Lampu spiritus
- 9) Korek api
- 10) Jangka sorong
- 11) Inkubator
- 12) Rak tabung
- 13) Rak pewarnaan

Bahan

- 1) Sampel klinis berupa urin, darah, dan atau dahak
- 2) Media *enrichment* : BHI *broth*
- 3) Media isolasi : BAP, MC
- 4) Media identifikasi : media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), TSIA, MR-VP, SIM, PAD, Urea, *Simmon's citrate*.
- 5) Media uji sensitivitas : media MHA
- 6) Disk antibiotik
- 7) NaCl 0,85% steril
- 8) Standar *McFarland 0,5*
- 9) Pewarnaan Gram
- 10) Reagen uji biokimia : Methyl red, α -naftol 5%, KOH 40%, Kovac's, FeCl₃ 10%, H₂O₂ 3%.

b) Persiapan Pasien

- 1) Untuk pengambilan sampel darah pada pasien tidak diperlukan persiapan khusus, namun sebaiknya dilakukan pengambilan sebelum terapi antibiotik atau 3 hari setelah pemberian antibiotik dihentikan.
- 2) Untuk pengambilan sampel urin tidak diperlukan persiapan khusus. Pengambilan spesimen sebaiknya sebelum pemberian antibiotik. Disarankan urin pagi pertama, namun jika tidak memungkinkan bisa dilakukan pengambilan urin 2 jam setelah buang air kecil terakhir.
- 3) Untuk pemeriksaan dahak/sputum, harus dilakukan pengumpulan sampel yang berasal dari paru-paru, bukan air liur. Dianjukan untuk berkumur dengan air bersih sebelum dilakukan pengumpulan sputum untuk mengurangi kontaminasi dari mulut. Pengumpulan sputum sebaiknya dilakukan pagi hari, sebelum makan atau minum, namun sputum yang diambil sewaktu juga cukup representatif. Jika pasien mengalami kesulitan mengeluarkan sputum, pada malam hari sebelumnya pasien diminta minum teh manis atau diberi obat gliserilguayakolat 200 mg.

c) Pemberian Identitas Spesimen

- 1) Spesimen harus diberi label yang berisi:
 - i. Nama pasien.
 - ii. Nomor identifikasi (nomor urut dari rumah sakit/laboratorium) atau tanggal lahir dan sumber lain sebagai identitas pasien tersebut.
- 2) Informasi yang dicantumkan pada label harus jelas dan bisa dicocokkan dengan formulir permintaan ketika diterima di laboratorium.

d) Pengambilan Spesimen

- 1) Spesimen darah
 - i. Siapkan alat dan bahan yang digunakan.
 - ii. Sterilkan area tempat pengambilan darah dengan menggunakan alkohol 70%, lalu dibiarkan kering.
 - iii. Ambil dan tampung darah sesuai dengan volume yang dibutuhkan (bayi : 1-2 ml, anak-anak : 2-5 ml, dewasa : 10-12 ml).
 - iv. Bersihkan kembali area tusukan, dan pasien diminta untuk menekan bekas tempat tusukan dengan kapas kering dalam keadaan tangan lurus agar darah tidak keluar terus-menerus.
 - v. Untuk pemeriksaan biakan aerob darah dimasukkan ke dalam media yang berisi *BHI broth*.

2) Spesimen urin porsi tengah

Pada pasien Wanita

- i. Pasien sebaiknya mencuci tangan dengan sabun dan air, lalu bilas dan keringkan dengan handuk / tisu.
- ii. Melebarkan labia dengan satu tangan, kemudian membersihkan labia dan vulva menggunakan sabun cair / kasa steril dari arah depan ke arah belakang.
- iii. Bilas area tersebut dengan air, dan keringkan dengan kasa steril / tisu.
- iv. Selama proses berlangsung, labia harus tetap terbuka lebar dan jari tangan tidak boleh menyentuh daerah yang sudah dibersihkan.
- v. Biarkan urin keluar beberapa cc, selanjutnya tampung urin pancaran tengah ke dalam wadah steril bertutup ulir. Pengumpulan urin selesai sebelum aliran urin tersebut habis.
- vi. Wadah ditutup rapat dan segera dikirim ke laboratorium.

Pada pasien Laki-laki

- i. Pasien sebaiknya mencuci tangan dengan sabun dan air, lalu dibilas sebelum melakukan pengambilan urin.
- ii. Bersihkan penis dengan sabun cair, jika tidak disirkumsisi tarik *foreskin* (kulit bagian depan) terlebih dahulu, dan cuci dengan sabun cair.
- iii. Bilas area tersebut dengan air.
- iv. Jaga *foreskin* tetap tertarik, biarkan urin keluar beberapa cc. Hindari urin mengenai lapisan tepi wadah.
- v. Tampung urin porsi tengah dalam wadah steril.
- vi. Wadah ditutup rapat dan segera dikirim ke laboratorium.

Pada spesimen berupa dahak/sputum

- i. Sebelum dilakukan pengambilan spesimen, pasien diminta untuk berkumur dengan air, dan bila menggunakan gigi palsu sebaiknya dilepas.
- ii. Pasien dipersilahkan berdiri tegak atau duduk tegak.
- iii. Pasien diminta untuk menarik napas dalam sebanyak 2-3 kali, kemudian keluarkan napas bersamaan dengan batuk yang kuat dan berulang kali sampai sputum keluar.
- iv. Sputum yang dikeluarkan ditampung langsung di dalam wadah, dengan cara mendekatkan wadah ke mulut.
- v. Amati keadaan sputum yang didapatkan, yang berkualitas baik akan tampak

kenal purulen dengan volume cukup 3-5 ml.

vi. Tutup wadah dengan erat dan segera dikirim ke laboratorium.

3) Penyimpanan Spesimen

- i. Spesimen darah tidak boleh disimpan dalam lemari pendingin. Penyimpanan dilakukan pada suhu ruang sampai dilakukan pemeriksaan maksimal dalam 4 jam.
- ii. Spesimen urin harus sudah sampai di laboratorium kurang dari 2 jam setelah pengambilan. Jika hal tersebut tidak memungkinkan, spesimen harus disimpan di lemari es (2-8°C) segera setelah pengambilan, selanjutnya harus sudah diproses di laboratorium dalam waktu 24 jam.
- iii. Spesimen dahak/sputum harus sudah sampai di laboratorium dalam waktu 1 jam. Jika hal ini tidak memungkinkan, spesimen harus disimpan di lemari es (2-8°C) segera setelah pengambilan.

4) Pengiriman Spesimen

Pengiriman spesimen dilakukan dengan menggunakan *coolbox* (2-8°C), kecuali jika waktu perjalanan yang dibutuhkan untuk pengiriman kurang dari 1-2 jam. Untuk spesimen darah harus dikirim menggunakan media transport atau media *enrichment*.

5) Kriteria Penolakan Spesimen

- i. Spesimen tidak mencantumkan identitas pasien yang jelas.
- ii. Botol / medium mengalami kerusakan / pecah.
- iii. Spesimen darah diterima lebih dari 12 jam setelah pengambilan dan tanpa media transport/*enrichment*.
- iv. Spesimen dahak/sputum yang berisi air liur.

5.3.2. Tahap Analitik

a) Persiapan Spesimen (H-1 sebelum praktikum) – Penanaman pada media *enrichment*

- 1) Spesimen darah atau dahak/sputum ditanam pada media *enrichment* BHI *broth* untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 2) Spesimen urin bisa langsung ditanam pada media isolasi.

Hari Pertama .

Penanaman pada media isolasi :

- i. Ssiapkan alat dan bahan.
- ii. Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu dibiarkan dingin.
- iii. Ambil 1 ose koloni dari media BHI *broth* (jika sampel dari darah atau dahak) atau

1 ose koloni dari sampel langsung (berupa urin), kemudian dilakukan inokulasi bakteri pada media BAP dan MC dengan goresan kuadran.

iv. Panaskan kembali ose bulat tersebut sampai membara.

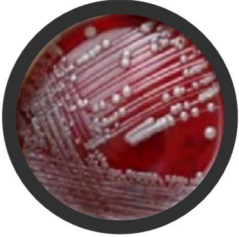
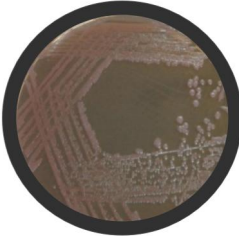
Pewarnaan Gram :

- i. Siapkan alat dan bahan.
- ii. Ambil 1 tetes NaCl 0,85% dan diletakkan pada *object glass*.
- iii. Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu biarkan dingin.
- iv. Ambil sebanyak 1 ose koloni dari media BHI *broth* atau dari urin langsung dan campurkan dengan NaCl 0,85%, lalu dibuat sediaan.
- v. Panaskan kembali ose bulat sampai membara, dan dibiarkan dingin.
- vi. Keringkan sediaan dan fiksasi dengan melewati *gelas objek* di atas api bunsen sebanyak 3x.
- vii. Teteskan Gram I (gentian violet) pada sediaan selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- viii. Teteskan Gram II (lugol) selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- ix. Teteskan Gram III (alkohol) selama 30 detik, lalu bilas dengan air mengalir.
- x. Teteskan Gram IV (safranin) selama 1-2 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- xi. Keringkan sediaan dengan meletakkan di posisi tegak atau menggunakan tisu.
- xii. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x menggunakan minyak imersi, meliputi morfologi bentuk koloni, warna, susunan, dan sifat bakterinya.
- xiii. Interpretasi hasil :
 - Bakteri Gram-positif akan berwarna ungu
 - Bakteri Gram-negatif akan berwarna merah.

Hari Kedua :

- a. Pengamatan koloni pada media isolasi
 - 1) Siapkan alat dan bahan.
 - 2) Amati pertumbuhan koloni bakteri pada media BAP dan MC. Jika pada saat pengamatan pertumbuhan bakteri hanya terjadi pada media BAP, lakukan identifikasi lanjutan menggunakan media identifikasi untuk bakteri Gram (+). Jika pada kedua media isolasi (BAP dan MC) terjadi pertumbuhan, lakukan identifikasi lanjutan menggunakan media identifikasi untuk bakteri Gram (-).
- b. Interpretasi hasil koloni yang tumbuh pada media isolasi:

Tabel 18
Karakteristik Koloni pada Media Isolasi

Spesies	Pertumbuhan Koloni pada Media Isolasi	Gambar
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Media BAP : Koloni kecil, bulat, cembung, berwarna putih keabu-abuan atau krem, mucoid, dan tidak berpigmen.	
	Media MC : Koloni sedang, berwarna merah, semi mucoid, <i>smooth</i> , memfermentasi laktosa.	

- c. Penanaman pada media identifikasi
- 1) Siapkan alat dan bahan.
 - 2) Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu dibiarkan dingin.
 - 3) Lakukan penanaman ke media identifikasi secara berturut-turut yaitu :
 - a) Media cair meliputi media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), dan media MR-VP. Ambil sebanyak 1 ose bulat koloni, lalu celupkan ke media tersebut secara berturut-turut tanpa mengambil koloni secara berulang dan selanjutnya homogenkan.
 - b) Media semi solid yaitu media SIM. Ambil sebanyak 1 ose jarum koloni, lalu tusukkan ose hingga ke dasar tabung.
 - c) Media padat meliputi media *Simmon's citrate*, media Urea, media PAD, dan media TSIA. Koloni yang ada ose jarum yang digunakan dari media semi solid tadi, selanjutnya goreskan secara zig-zag pada media padat, tanpa mengambil koloni ulang. Khusus untuk TSIA setelah digoreskan, lakukan penusukan dengan ose hingga ke dasar tabung.
 - 4) Panaskan kembali ose bulat dan ose jarum tersebut sampai membara.
 - 5) Selanjutnya inkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam.
- d. Uji Katalase

- 1) Siapkan alat dan bahan.
- 2) Panaskan ose bulat dari ujung sampai pangkal hingga membara, lalu biarkan dingin.
- 3) Fiksasi *gelas objek* dengan melewati di atas nyala api bunsen.
- 4) Teteskan 1 tetes H₂O₂ 3% pada *object glass*, kemudian ambil 1 ose koloni dari media MC, lalu dihomogenkan.
- 5) Amati adanya gelembung pada *object glass*.
- 6) Interpretasi hasil :
 - Positif ditandai dengan adanya gelembung udara.
 - Negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara.

Hari Ketiga :

- a. Pengamatan pertumbuhan koloni pada media identifikasi dan reaksi uji biokimia.
 - 1) Siapkan alat dan bahan.
 - 2) Amati pertumbuhan dan ciri khas koloni bakteri pada media selektif dan media identifikasi.
 - 3) Lakukan penambahan reagen pada beberapa media sebagai berikut :
 - a) MR : tambahkan larutan Methyl Red
 - b) VP : tambahkan larutan α -naftol 5% dan KOH 40%
 - c) SIM : tambahkan larutan Kovacs
 - d) PAD : tambahkan larutan FeCl₃ 10%

Tabel 19

Interpretasi Hasil pada Media Identifikasi dan Reaksi Biokimia

No.	Media Identifikasi	Interpretasi Hasil
1	Media Gula-gula	<ul style="list-style-type: none"> - Positif gas (+) : terbentuk perubahan warna dari merah menjadi kuning (indikator <i>phenol red</i>) dan di dalam tabung durham terbentuk gelembung udara. - Positif (+) : terbentuk perubahan warna dari merah menjadi kuning (indikator <i>phenol red</i>). - Negatif (-) : tidak terjadi perubahan warna.
2	Media MR	<ul style="list-style-type: none"> - Positif (+) : terjadi perubahan warna merah - Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
3	Media VP	<ul style="list-style-type: none"> - Positif (+) : terjadi perubahan warna merah - Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
4	Media SIM	<ul style="list-style-type: none"> - Sulfur / H₂S positif (+) : terdapat endapan hitam pada media - Indol positif (+) : terbentuk cincin berwarna merah

		<ul style="list-style-type: none"> - Motility positif (+) : terjadi pertumbuhan yang menyebar keluar dari garis inokulasi, dan terjadi kekeruhan - Negatif (+) : tidak terjadi perubahan
5	Media <i>Simmon's citrate</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Positif (+) : terjadi perubahan warna biru - Negatif (-) : tetap warna hijau, tidak terjadi perubahan warna
6	Media Urea	<ul style="list-style-type: none"> - Positif (+) : terjadi perubahan warna pink / merah muda - Negatif (-) : tetap warna kuning, tidak terjadi perubahan warna
7	Media PAD	<ul style="list-style-type: none"> - Positif (+) : terjadi perubahan warna hijau - Negatif (-) : warna tetap kuning, tidak terjadi perubahan warna
8	Media TSIA	<ul style="list-style-type: none"> - Lereng : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam) - Dasar : merah (K = Alkali) / kuning (A = asam) - H₂S (positif / negatif) - Gas (positif / negatif)

b. Uji Sensitivitas Antibiotik

- 1) Setelah jenis bakteri yang terdapat dalam spesimen teridentifikasi, selanjutnya dilakukan uji sensitivitas bakteri tersebut terhadap beberapa antibiotik.
- 2) Cara ujinya menggunakan uji resistensi antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer) sebagai berikut:
 - a) Dibuat suspensi bakteri uji dengan derajat kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan *Mc Farland* 0.5
 - b) Subkultur suspensi bakteri uji tersebut dengan menggunakan lidi kapas pada media MHA, sampai seluruh permukaan MHA tertutup rapat dengan goresan, biasanya dilakukan 4 kali goresan dan 1 kali putaran di bagian pinggir MHA, selanjutnya dibiarkan 5 menit supaya suspensi bakteri uji meresap dalam media MHA
 - c) Tempelkan disk antibiotik pada permukaan media MHA menggunakan pinset steril, dengan jarak antar disk kurang lebih 15 mm.
 - d) Inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
 - e) Pengukuran luas diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik menggunakan jangka sorong.
 - f) Catat diameter zona hambatan yang terbentuk, dan bandingkan dengan tabel standar manual CLSI. Pelaporan hasil adalah sensitif, intermediate, atau resisten.

5.3.3. Tahap Pasca Analitik

a) Pelaporan Hasil

- 1) Setelah hasil identifikasi ditemukan secara lengkap dengan spesiesnya, lakukan pencatatan atau pelaporan hasil pemeriksaan, kemudian menarik kesimpulan berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi, serta uji sensitivitas antibiotik.
- 2) Hasil yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan tabel standar isolasi dan identifikasi.

Tabel 20

Standar Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri

No.	Spesies	Glu	Lac	Suc	Mal	Man	MR	VP	SIM	SC	Urea	PAD	TSIA
1	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	+/-	-	-	-	-/-	+	-	+	-/-/-
		Katalase : +											

b) Sumber Kesalahan Pemeriksaan

Sumber kesalahan yang kemungkinan dapat ditemukan selama tahapan identifikasi adalah sebagai berikut :

- 1) Spesimen tidak disimpan atau dikirim sesuai suhu yang dianjurkan (suhu kamar atau pendingin tergantung permintaan).
- 2) Pengambilan spesimen tidak sesuai waktu ideal (misalnya, setelah terapi antibiotik dimulai).
- 3) Kesalahan inokulasi media (jumlah inokulum terlalu banyak atau terlalu sedikit).
- 4) Kontaminasi silang sampel.
- 5) Penulisan atau pelaporan salah nama spesies atau hasil uji sensitivitas antibiotik.
- 6) Penggunaan singkatan yang tidak jelas atau berbeda interpretasi.

c) Jaminan Mutu Pemeriksaan

1) Perawatan Peralatan

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan laboratorium adalah peralatan laboratorium, sehingga haruslah dirawat dengan baik, serta selalu di kalibrasi. Berikut ini kendali mutu peralatan laboratorium disajikan pada Tabel berikut

Tabel 21

Kendali Mutu Peralatan di Laboratorium

Peralatan	Perawatan Rutin	Pemantauan	Pemeliharaan dan Inspeksi Teknis
<i>Autoclave</i>	Bersihkan dan ganti air setiap bulan	<ul style="list-style-type: none"> - Periksa dan sesuaikan tinggi air sebelum setiap penggunaan. - Catat waktu dan suhu atau tekanan setiap kali digunakan. - Catat kinerja dengan carik spora setiap minggu. 	Setiap 6 bulan
Oven	Bersihkan bagian dalamnya setiap bulan	Catat waktu dan suhu setiap penggunaan	Setiap 6 bulan
Inkubator	Bersihkan dinding-dinding dalam dan rak-raknya setiap bulan	Catat suhu pada setiap permulaan hari kerja (yang diperbolehkan $35\pm 1^{\circ}\text{C}$).	Setiap tahun
Mikroskop	Lap lensa dengan kertas tisu atau kertas lensa setiap akhir hari kerja. Bersihkan dan lumasi alas mekanik setiap minggu. Lindungi dengan sarung jika tidak digunakan.	<ul style="list-style-type: none"> - Periksa kesejajaran kondensor setiap bulan. - Tempatkan cakram silica biru di bawah sarung mikroskop untuk mencegah pertumbuhan jamur pada udara lembab 	Setiap tahun

2) Media Biakan

Uji kualitas media mencakup aspek yang luas, baik media buatan sendiri maupun media jadi, oleh karena itu penyiapan media harus mendapat perhatian. Sebelum digunakan harus dilakukan uji kualitas media.

i. Pengujian pH Media

Media yang telah dibuat dilakukan pengujian pH. Jika pH media terlalu asam, maka ditambah dengan NaOH dan jika pH media terlalu basa maka ditambah dengan H_2SO_4 hingga diperoleh pH yang sesuai dengan ketentuan.

ii. Uji Sterilitas Media

- a. Media yang telah di sterilisasi, diambil secara acak beberapa kelompok media dan dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu $35^{\circ} - 37^{\circ}\text{C}$ selama 1-2 x 24 jam.
- b. Jika setelah diinkubasi kelompok media tersebut ditumbuhi oleh lebih dari 2 koloni bakteri per cawan, maka sterilisasi dinyatakan gagal, dan media-media tersebut harus dibuang semua.

- c. Hasil uji sterilitas media disimpan.
- 3) Penanaman bakteri kontrol positif dan kontrol negatif. hasil uji media perbenihan dan kultur menggunakan kontrol CLSI, disajikan pada Tabel berikut ini.

Tabel 22

Uji Media Perbenihan dan Kultur Menggunakan Kontrol CLSI

Media	Inkubasi	Organisme Kontrol	Hasil yang diharapkan
MC	24 jam aerob	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Koloni merah
		<i>P.mirabilis</i> (ATCC 29906)	Koloni tak berwarna
MR	48 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Positif
		<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	Negatif
MHA	24 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Diameter zona yang dapat diterima lihat CLSI
		<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	
PAD	24 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Negatif
		<i>P.mirabilis</i> (ATCC 29906)	Positif
SC	48 jam	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	Tidak tumbuh
		<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	Biru

4) Reagensia

Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut:

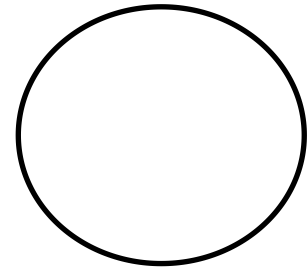
- i. Pengujian kualitas reagen seperti zat pewarna bakteri dapat dilakukan setiap kali pembuatan larutan/reagen yang baru, serta berkala secara mingguan.
- ii. Cat / reagensia dapat dibuang atau tidak dipakai apabila tanggal kadaluarsanya telah melampaui batas, atau jika ditemukan adanya perubahan warna, kekeruhan, dan adanya endapan.

Hasil Pengamatan

Hari Pertama

Pewarnaan Gram

Warna :
Bentuk :
Susunan :
Sifat :

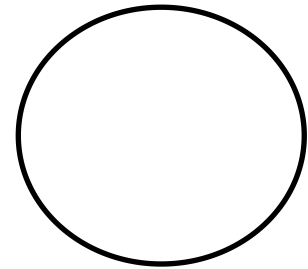


Hari Kedua

Pembacaan Koloni pada Media Isolasi

Media MC

Bentuk :
Ukuran :
Warna :
Tepi :
Elevasi :
Konsistensi :
Fermentasi laktosa :



Pembacaan Hasil Uji Katalase

Uji Katalase :

Hari Ketiga

Pembacaan Hasil Identifikasi

Media Identifikasi dan Biokimia	Hasil
Media gula-gula	
Media TSIA	
Media MR	
Media VP	
Media SIM	
Media SC	
Media Urea	
Media PAD	

Hari Keempat

Pembacaan Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik

Disk Antibiotik	Luas diameter zona hambat (mm)	Kategori* (S/I/R)

*Penentuan kategori berdasarkan standar CLSI : S – Sensitif, I – Intermediet, R - Resisten

Kesimpulan :

.....
.....
.....

Pembahasan

.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

5.5 EVALUASI

a) Tugas Latihan

- 1) Lakukan isolasi dan identifikasi sampel darah/urin/sputum seperti prosedur di atas!
- 2) Buatlah pelaporan hasil dan pembahasan dari praktikum yang telah dilakukan!

b) Tes Formatif

- 1) Apa saja jenis spesimen yang dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial?
- 2) Jelaskan mengapa *Acinetobacter baumannii* tidak tumbuh pada media TSIA?

Tabel 23

Rubrik Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil identifikasi	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi nosokomial 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi nosokomial 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi nosokomial 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada media 3. Melakukan isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif penyebab infeksi nosokomial 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar
Hasil uji resistensi	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut :	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut :	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut :	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut :

antibiotik	<ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat. 	<ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat. 	<ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat. 	<ol style="list-style-type: none"> Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik Menginterpretasikan hasil dengan tepat dan dibandingkan dengan standar CLSI. Melakukan pelaporan hasil dengan tepat.
------------	--	--	--	--

Afektif (Attitude)

Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis Menjadga kebersihan lingkungan kerja Berlaku sopan dan santun Menjalankan prosedur K3 dengan baik 	Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis Menjadga kebersihan lingkungan kerja Berlaku sopan dan santun Menjalankan prosedur K3 dengan baik 	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: <ol style="list-style-type: none"> Menggunakan APD lengkap Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis Menjadga kebersihan lingkungan kerja Berlaku sopan dan santun Menjalankan prosedur K3 dengan baik

Kognitif (Kemampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)

Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: <ol style="list-style-type: none"> Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial Mampu menjelaskan 	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: <ol style="list-style-type: none"> Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial Mampu menjelaskan 	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: <ol style="list-style-type: none"> Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial Mampu menjelaskan 	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: <ol style="list-style-type: none"> Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi nosokomial

	tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya
--	---	---	---	--

5.6 RINGKASAN

Infeksi nosokomial umumnya terjadi pada pasien yang menjalani perawatan di rumah sakit disebabkan adanya kontaminasi dari fasilitas kesehatan yang terkontaminasi bakteri patogen. Infeksi nosokomial biasanya menyerang pasien yang berada pada kondisi *immunocompromized*, dan yang paling sering terkena infeksi ini adalah pasien yang berada pada ruang perawatan *Intensive Care Unit (ICU)*. *Acinetobacter baumannii* merupakan salah satu bakteri patogen yang menyebabkan infeksi nosokomial. Spesies ini dapat diisolasi dari beberapa jenis spesimen diantaranya darah, urin, dan dahak/sputum. ATLM penting untuk mengetahui prosedur yang sesuai dalam identifikasi bakteri karena kesalahan pemilihan metode atau prosedur pengujian kultur dan uji resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat menyebabkan terjadinya kesalahan diagnosis dan terapi. Isolasi dan identifikasi bakteri *A.baumannii* yang akurat sangat penting untuk penanganan infeksi yang tepat dan pencegahan penyebaran.

5.7 GLOSSARIUM

ATCC	:	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	:	<i>Brain Heart Infusion</i>
BAP	:	<i>Blood Agar Plate</i>
CLSI	:	<i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>
EMBA	:	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
FeCl ₃	:	<i>Ferric Chloride</i>
H ₂ O ₂	:	Hidrogen Peroksida
H ₂ S	:	Hidrogen Sulfida
KOH	:	Kalium Hidroksida
MC	:	<i>Mac Conkey</i>
MHA	:	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MR	:	<i>Methyl Red</i>
PAD	:	<i>Phenylalanine Deaminase</i>
SC	:	<i>Simmon's citrate</i>

SIM	:	<i>Sulfide Indole Motility</i>
TSIA	:	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
VP	:	<i>Voges Proskauer</i>

5.8 DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, F. G., Butel, J.S, and Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Salemba Medika.
- Delost, M.D. 2018. *Mikrobiologi Diagnostik untuk Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. 2019. *Buku Ajar Pemeriksaan Mikrobiologi Pada Penyakit Infeksi*. Jakarta : CV. Sagung Seto.
- Jaloot, A.S., Al-Ouqaili, M.T.S., Badawy, A. 2013. Detection of Genes Encording for Metallo- β -lactamases Produced by Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas spp.* Isolated From Clinical Specimens in Ramadi. *Thesis. College of Education for Pure Sciences*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Prosedur Pemeriksaan Bakteriologi Klinik*. Jakarta : Kemenkes RI.
- Kurniawan, F.B. & Sahli, I.T. 2017. *Bakteriologi : Praktikum Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kuswiyanto. 2016. *Bakteriologi 2 : Buku Ajar Analisis Kesehatan*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Leboffe, M.J. & Pierce, E.B. 2011. *A Photographic for The Microbiology Laboratory*, 4th Edition. USA : Morton Publisher Company.
- Microbe Notes. 2022. *Acinetobacter baumannii – An Overview*. Diakses 20 Juni 2025 dari <https://microbenotes.com/acinetobacter-baumannii/>.
- Soemarno. 2000. *Identifikasi Bakteriologi Klinik*. Yogyakarta : Akademi Analisis Kesehatan.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2019. *Microbiology : An Introduction*, Thirteenth Edition. Boston : Pearson.
- Utami, P.R. & Indrayati, S. 2023. *Buku Ajar Pengantar Bakteriologi Dasar Untuk ATLM*. Sleman : Penerbit Deepublish
- Saikia, S., Gogoi, I., Onyango, A.O., Sharma, M. 2024. Co-production of Metallo- β -lactamase and OXA-type β -lactamase in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in North East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40:167

BAB VI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI PADA SISTEM SYARAF

6.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran topik ini adalah :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi pada Sistem Syaraf
- 2) Mahasiswa mampu melakukan Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi pada Sistem Syaraf
- 3) Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi pada Sistem Syaraf

6.2. PENDAHULUAN

Infeksi sistem saraf pusat (SSP) merupakan kondisi medis serius yang dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, virus, jamur, dan parasit. Dua bakteri yang paling sering diidentifikasi sebagai penyebab infeksi SSP adalah *Neisseria meningitidis*, penyebab utama meningitis bakterial, dan *Clostridium tetani*, penyebab tetanus yang menyerang sistem saraf melalui produksi toksin.

Spesimen seperti cairan serebrospinal (CSF) diambil melalui prosedur pungsi lumbal, yang memerlukan ketelitian dan keterampilan untuk mencegah kontaminasi serta komplikasi. Sementara itu, sampel dari luka tusuk untuk dugaan tetanus perlu diambil dari bagian terdalam luka dengan mempertahankan kondisi anaerob, karena *C. tetani* bersifat anaerob obligat. Pemahaman yang baik tentang alat, prinsip, dan prosedur pengambilan spesimen akan meminimalkan kesalahan pra-analitik yang dapat mempengaruhi keakuratan diagnosis.

Clostridium tetani adalah bakteri gram-positif berbentuk basil, berspora terminal, dan anaerob obligat yang menghasilkan toksin tetanospasmin. Infeksi biasanya terjadi melalui luka tusuk yang tercemar spora bakteri dari tanah atau lingkungan. *Clostridium tetani* sulit diisolasi dan tumbuh lambat di lingkungan anaerob, maka identifikasi dilakukan terutama melalui pemeriksaan morfologi mikroskopis (Gram stain) dan kultur anaerob. Diagnosis laboratorium bertujuan mendukung diagnosis klinis yang sudah didasarkan pada gejala khas tetanus (trismus, spasme otot, opisthotonus).

6.3. PROSEDUR KERJA

6.3.1. Tahap Pra Analitik

a) Tujuan Pemeriksaan

Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penyebab infeksi sistem saraf, terutama *Neisseria meningitidis* (pada kasus meningitis) dan *Clostridium tetani* (pada kasus tetanus), guna menunjang diagnosis klinis dan penentuan terapi antimikroba yang tepat.

b) Metode

CSF: Pungsi Lumbal (Lumbar Puncture)

Eksudat luka/jaringan nekrotik: Swab Luka Anaerob / Aspirasi Jaringan Luka

- 1) Pewarnaan Gram
- 2) Kultur dalam kondisi anaerob
- 3) Pemeriksaan morfologi koloni
- 4) Konfirmasi toksin melalui uji biologis atau molekuler

c) Prinsip

CSF: Pungsi Lumbal adalah prosedur invasif yang dilakukan dengan menusukkan jarum steril ke ruang subaraknoid di antara vertebra lumbal (umumnya L3–L4 atau L4–L5) untuk mengambil cairan serebrospinal (CSF) secara aseptik.

Eksudat luka/jaringan nekrotik: Pengambilan eksudat luka dalam dilakukan pada bagian terdalam luka tusuk (luka anaerobik) dengan teknik yang menjaga kondisi anaerob. Ini penting karena *C. tetani* hanya tumbuh optimal dalam lingkungan tanpa oksigen.

- 1) Pewarnaan Gram: Menentukan bentuk, warna, dan struktur spora pada bakteri anaerob menggunakan pewarnaan Gram.
 - 2) Uji Oksidase: *Clostridium tetani* hanya tumbuh pada media khusus dalam suasana anaerobik.
 - 3) Fermentasi Gula: *Clostridium tetani* bersifat motil dan menunjukkan difusi pertumbuhan dalam media semi padat.
- d) Jenis dan kriteria spesimen/syarat sampel dapat dilihat pada Tabel berikut :

Tabel 24

Jenis dan kriteria spesimen Bakteri Penyebab Infeksi Pada Sistem Syaraf

Bakteri	Jenis Spesimen	Syarat Sampel
<i>Neisseria meningitidis</i>	Cairan serebrospinal (CSS)	Segera diperiksa (<1 jam), tidak dibekukan, dikirim dalam kondisi hangat (37°C)
<i>Clostridium tetani</i>	Eksudat luka/jaringan nekrotik	Diambil dalam kondisi anaerob, dimasukkan ke dalam tabung anaerob atau media transport anaerob

e) Alat dan bahan

CSF:

- 1) Jarum spinal steril (22G atau 23G)
- 2) S spuit 5–10 mL steril
- 3) Tabung steril (3–4 buah, diberi label untuk mikrobiologi, kimia, dan sitologi)
- 4) Sarung tangan steril
- 5) Masker, kain penutup steril
- 6) Povidone iodine / antiseptik kulit
- 7) Plester dan kasa steril
- 8) Troli atau peralatan Pungsi Lumbal standar
- 9) Formulir permintaan pemeriksaan

Eksudat luka/jaringan nekrotik:

- 1) Jarum suntik 3–5 mL + spuit steril (untuk aspirasi)
- 2) Swab steril + media transport anaerob (seperti Cary Blair atau Amies anaerob)
- 3) Sarung tangan dan masker
- 4) Antiseptik (povidone iodine)
- 5) Label dan formulir pemeriksaan
- 6) Tabung vakum atau vial anaerob (jika menggunakan sistem tertutup)

6.3.2. Tahap Analitik

a) Prosedur kerja untuk bahan CFS

- 1) Pasien diminta posisi menyamping (fetal) atau duduk membungkuk
- 2) Pastikan pasien tenang dan sudah diinformasikan tentang prosedur
- 3) Bersihkan area punggung bawah dengan povidone iodine, mulai dari pusat ke luar
- 4) Tutupi area dengan kain steril
- 5) Petugas mengenakan sarung tangan steril
- 6) Tentukan lokasi pungsi (antara L3–L4 atau L4–L5)
- 7) Jarum spinal dimasukkan perlahan-lahan secara tegak lurus ke ruang subaraknoid
- 8) Setelah terasa "give-way", cairan CSF akan menetes keluar

- 9) Tangkap tetesan CSF ke dalam 3–4 tabung steril:
 - Tabung 1: biokimia
 - Tabung 2: mikrobiologi
 - Tabung 3: sitologi
 - 10) Angkat jarum, bersihkan lokasi, tutup dengan kasa dan plester
 - 11) Biarkan pasien dalam posisi berbaring ±1 jam
 - 12) Kirim tabung mikrobiologi segera ke laboratorium.
- b) Prosedur kerja untuk bahan Eksudat luka/jaringan nekrotik:
- 1) Metode 1: Aspirasi Luka (direkomendasikan)
 - i. Bersihkan permukaan luka dengan antiseptik, jangan disinfeksi terlalu dalam.
 - ii. Gunakan jarum suntik steril untuk mengaspirasi cairan atau eksudat dari bagian terdalam luka.
 - iii. Hindari masuk angin (udara) ke dalam spuit.
 - iv. Jika mungkin, masukkan ke dalam vial transport anaerob.
 - v. Segera kirim ke laboratorium mikrobiologi.
 - 2) Metode 2: Swab Luka Dalam (bila aspirasi tidak memungkinkan)
 - i. Gunakan swab steril yang telah dibasahi NaCl steril.
 - ii. Masukkan swab ke bagian terdalam luka, putar perlahan selama 10–15 detik.
 - iii. Masukkan ke dalam tabung media transport anaerob.
 - iv. Tutup rapat dan segera kirim ke laboratorium.
- c) Pewarnaan Gram
- 1) Ambil koloni dari media anaerob (blood agar anaerob atau thioglycolate broth).
 - 2) Siapkan sediaan di object glass, fiksasi dengan pemanasan.
 - 3) Lakukan pewarnaan Gram.
 - 4) Amati di bawah mikroskop.
 - 5) Pemeriksaan Koloni dalam kondisi anaerob
 - 6) Amati media anaerob setelah inkubasi 48–72 jam di suhu 37°C.
 - 7) Perhatikan koloni pada blood agar anaerob.
- d) Uji Motilitas

- 1) Inokulasi bakteri ke media SIM
 - 2) Inkubasi 24–48 jam dalam kondisi anaerob.
 - 3) Amati difusi pertumbuhan dari titik inokulasi.
- e) Nilai Normal
Tidak ditemukan bakteri *Clostridium tetani*
- f) Nilai Kritis
Ditemukan bakteri *Clostridium tetani*
- g) Perhitungan

6.7.3. Tahap Pasca Analitik

- a) Pelaporan hasil
- 1) Pemeriksaan: Pewarnaan Gram
Hasil: Basil gram-positif dengan spora terminal
Interpretasi: Ciri khas *Clostridium tetani*
 - 2) Pemeriksaan: Kultur anaerob
Hasil: Koloni menyebar (swarming), hemolitik
Interpretasi: Diduga *Clostridium tetani*
- b) Sumber kesalahan pemeriksaan
- 1) Spesimen terlambat diperiksa → bakteri mati.
 - 2) Spesimen CSS disimpan dalam suhu dingin → *Neisseria* tidak bertahan.
 - 3) Tidak menggunakan kondisi anaerob → *Clostridium tetani* gagal tumbuh.
 - 4) Pewarnaan Gram yang tidak benar → interpretasi morfologi salah.
 - 5) Kontaminasi silang saat inokulasi.
- c) Jaminan mutu pemeriksaan
- 1) Alat bahan yang digunakan steril
 - 2) Kalibrasi autoklaf
 - 3) Kalibrasi inkubator dan anaerobic jar secara berkala.
 - 4) Uji kontrol positif dan negatif secara periodik.
 - 5) Validasi media kultur sebelum digunakan.
 - 6) Penerapan SOP dan dokumentasi setiap tahapan pemeriksaan.
 - 7) Pelatihan rutin bagi petugas laboratorium
 - 8) Pastikan suasana anaerob dijaga secara konsisten (anaerobic jar, indikator anaerob)
 - 9) Gunakan kontrol positif dan negatif jika memungkinkan

- 10) Validasi media anaerob (blood agar anaerob, thioglycolate broth) sebelum digunakan
- 11) Alat sterilisasi seperti autoklaf dan inkubator dikalibrasi secara berkala
- 12) Terapkan SOP pemeriksaan dan dokumentasi hasil dengan baik.

6.4. LAPORAN PRAKTIKUM

a) Identitas Sampel :

Hari ke-0, Tanggal :

- 1) Dilakukan penanaman spesimen ke dalam media:
- 2) CSF → Chocolate Agar, Blood Agar,
- 3) Eksudat Luka → Thioglycolate Broth / Media Anaerob (Blood Agar Anaerob)

Inkubasi:

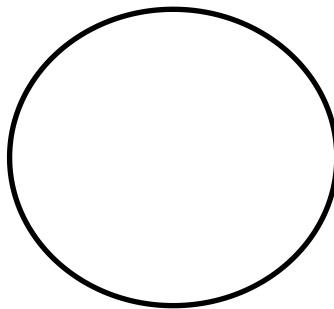
- 1) CSF: 37°C dalam CO₂ incubator selama 24 jam
- 2) Eksudat luka: 37°C dalam kondisi anaerob selama 48–72 jam

Hari ke-1, Tanggal :

- 1) Pembuatan preparat dari media kultur, dilakukan pengecatan Gram.

Hasil Gram:

Sifat Gram :
 Bentuk :
 Susunan :
 Warna Sel :
 Spora (jika ada) :
 Interpretasi Awal :



- 2) Untuk dugaan *Neisseria meningitidis*:

Lakukan uji oksidase

Jika positif, lanjut ke uji fermentasi glukosa dan maltosa

- 3) Untuk dugaan *Clostridium tetani*:

Lakukan pengamatan morfologi koloni anaerob

Subkultur dilakukan pada media anaerob segar bila diperlukan

Hari ke-2, Tanggal :

- 1) Lakukan pengamatan morfologi makroskopis koloni bakteri pada media:

Interpretasi Gram dan Kultur

- a) *N. meningitidis*: diplokokus Gram-negatif, oksidase (+)
- b) *C. tetani*: basil Gram-positif, terminal spora, anaerob

Hari ke-4, Tanggal:

- 1) Pembacaan hasil uji resistensi bakteri terhadap antibiotik antibiotik metode difusi disk (modifikasi metode Kirby-Bauer). Luas diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik diukur menggunakan jangka sorong

Disk Antibiotik	Luas Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori* (S/I/R)
Penicillin		
Ceftriaxone		
Ciprofloxacin		
Tetracyclin		
Spectinomycin		

*Penentuan Kategori menggunakan acuan CLSI, S: Sensitif; I: intermediet; R: Resisten

6.5. EVALUASI

- 1) Jelaskan perbedaan karakteristik antara *Neisseria meningitidis* dan *Clostridium tetani* dari aspek:
 - a) Morfologi mikroskopis
 - b) Tipe pewarnaan Gram
 - c) Toksin yang dihasilkan
 - d) Kondisi pertumbuhan (aerob/anaerob)
- 2) Buatlah diagram alur proses identifikasi *Clostridium tetani* mulai dari pengambilan sampel luka hingga uji konfirmasi laboratorium.

Tabel 25
Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi
Pada Sistem Syaraf

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil identifikasi	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan	Memenuhi seluruh kriteria sebagai berikut: 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram postif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan

	identifikasi dengan benar	identifikasi dengan benar	kesimpulan identifikasi dengan benar	identifikasi dengan benar
Hasil uji resistensi antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik
Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kamampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan Media dan reagensia yang digunakan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar

	<ol style="list-style-type: none"> 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	<ol style="list-style-type: none"> 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	<ol style="list-style-type: none"> 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan dengan benar 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram 	<ol style="list-style-type: none"> 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram
<p>Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan secara berurutan</p>	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 	<p>Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 	<p>Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 	<p>Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan penanganan sampel dengan benar 2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit 3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar 4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya

	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	4. benar Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya	
--	--	--	--	--

6.6. RINGKASAN

Identifikasi *Neisseria meningitidis* dilakukan melalui analisis koloni dari kultur CSS menggunakan pewarnaan Gram, uji oksidase, serta fermentasi glukosa dan maltosa. Hasil yang khas berupa diplokokus gram-negatif, oksidase positif, dan fermentasi dua gula tersebut dapat membedakan *N. meningitidis* dari spesies lain dalam genus *Neisseria*.

6.7. GLOSARIUM

Oksidase : Enzim yang mengindikasikan keberadaan sistem pernapasan aerob.
 Fermentasi : Proses metabolisme anaerob menghasilkan asam dari karbohidrat.
 Diplokokus : Bakteri berbentuk bulat berpasangan.
 Gram-negatif : Kategori bakteri berdasarkan struktur dinding sel yang tidak menyerap kristal violet.

6.8. DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2021). *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (28th ed.). McGraw-Hill Education.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2022). *Sherris Medical Microbiology* (7th ed.). McGraw-Hill Education.
- World Health Organization. (2018). *Laboratory Methods For The Diagnosis Of Meningitis Caused By Neisseria Meningitidis, Streptococcus Pneumoniae, And Haemophilus Influenzae*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260807>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Meningococcal Disease – Diagnosis And Testing*. <https://www.cdc.gov/meningococcal/clinical-info/diagnosis-testing.html>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing* (28th ed., CLSI supplement M100). CLSI.
- Cheesbrough, M. (2017). *District Laboratory Practice In Tropical Countries* (2nd ed.). Cambridge University Press.

- Topley, W. W. C., & Wilson, G. S. (2022). *Topley & Wilson's Microbiology And Microbial Infections* (11th ed.). Wiley-Blackwell.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2021). *Medical Microbiology* (9th Ed.). Elsevier.
- Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B., & Wilfert, C. M. (2019). *Zinsser Microbiology* (23rd ed.). McGraw-Hill Education.
- Mandell, G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R. (Eds.). (2020). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases* (9th ed.). Elsevier.

BAB VII

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI GENITALIA

7.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip isolasi dan identifikasi *Neisseria gonorrhoeae* penyebab infeksi genitalia.
- 2) Mahasiswa mampu melakukan prosedur pengambilan spesimen, pewarnaan Gram, kultur, dan uji identifikasi biokimia terhadap *Neisseria gonorrhoeae*
- 3) Mahasiswa mampu melakukan interpretasi hasil pemeriksaan dan menarik kesimpulan dari proses isolasi dan identifikasi bakteri.

7.2. PENDAHULUAN

Infeksi genitalia oleh *Neisseria gonorrhoeae* merupakan salah satu penyakit menular seksual (PMS) yang umum dan serius, yang dapat menimbulkan komplikasi pada sistem reproduksi, termasuk infertilitas. Bakteri ini termasuk Gram negatif, berbentuk diplokokus, dan bersifat oksidase positif. *Neisseria gonorrhoeae* menginfeksi mukosa uretra, serviks, rektum, dan faring. Diagnosis laboratorium dilakukan melalui pewarnaan Gram dari swab uretra atau serviks, diikuti kultur pada media Thayer-Martin selektif dan identifikasi biokimia.

7.3. PROSEDUR KERJA

7.3.1. Tahap Pra Analitik

- 1) Tujuan Pemeriksaan

Untuk melakukan isolasi dan identifikasi *Neisseria gonorrhoeae* dari spesimen urogenital untuk menunjang diagnosis klinis.

- 2) Metode
 - a) Pengambilan swab uretra/serviks
 - b) Pewarnaan Gram
 - c) Kultur pada media selektif Thayer-Martin
 - d) Uji biokimia dan oksidase

- 3) Prinsip

Neisseria gonorrhoeae hanya tumbuh pada media khusus dalam kondisi CO₂ 5–10%. Pemeriksaan utama dilakukan dengan pewarnaan Gram, uji oksidase, dan fermentasi

gula (glukosa).

- 4) Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel
 - a) Swab uretra atau serviks
 - b) Dikirim dalam media transport Amies dengan arang, segera dikultur (<6 jam)
- 5) Alat dan bahan
 - Alat
 - a) Swab steril
 - b) Media Thayer-Martin selektif
 - c) Mikroskop
 - Bahan
 - d) Reagen Gram
 - e) Reagen uji oksidase
 - f) Reagen fermentasi gula

7.3.2. Tahap Analitik

- 1) Prosedur kerja
 - a) Ambil spesimen swab uretra/serviks
 - b) Siapkan preparat pewarnaan Gram
 - c) Lakukan kultur pada media Thayer-Martin
 - d) Inkubasi pada suhu 35–37°C dalam inkubator CO₂ selama 24–48 jam
 - e) Amati pertumbuhan koloni: bulat, kecil, abu-abu
 - f) Uji oksidase (positif)
 - g) Fermentasi hanya glukosa (tanpa maltosa/laktosa)
- 2) Nilai Normal

Tidak ditemukan bakteri *Neisseria gonorrhoeae*
- 3) Nilai Kritis

Ditemukan diplokokus Gram negatif intraseluler pada pewarnaan Gram, dan pertumbuhan koloni khas pada Thayer-Martin
- 4) Perhitungan

7.7.3. Tahap Pasca Analitik

- 1) Pelaporan hasil
 - a) Pemeriksaan Gram: diplokokus Gram negatif, sering berada intraseluler dalam leukosit

- b) Pemeriksaan kultur: koloni abu-abu, kecil, uji oksidase positif
 - c) Interpretasi: Ditemukan *Neisseria gonorrhoeae*
- 2) Sumber kesalahan pemeriksaan
 - a) Spesimen dikirim terlambat
 - b) Inkubasi tidak dalam CO₂
 - c) Media kultur tidak selektif
 - d) Pewarnaan Gram tidak optimal
 - 3) Jaminan mutu pemeriksaan
 - a) Validasi media Thayer-Martin
 - b) Penggunaan kontrol positif dan negatif
 - c) Kalibrasi inkubator CO₂
 - d) Penerapan SOP dan dokumentasi

7.4. LAPORAN PRAKTIKUM

Identitas Sampel :

Hari ke-0, Tanggal :

- 1) Dilakukan penanaman spesimen swab uretra/serviks ke dalam media Thayer-Martin selektif.
- 2) Diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5–10% pada suhu 37°C selama 24–48 jam.

Hari ke-1, Tanggal :

- 1) Dilakukan pembuatan preparat dari koloni media Thayer-Martin, kemudian dilakukan pengecatan Gram.

Hasil Gram

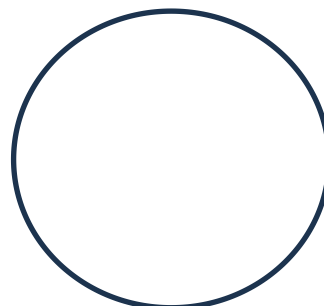
Sifat Gram :

Bentuk :

Susunan :

Warna Sel :

Sifat :



- 2) Jika ditemukan bakteri Gram negatif berbentuk diplokokus, dilanjutkan dengan uji oksidase.

Jika hasil uji oksidase positif, maka dilakukan subkultur ke media TSIA/KIA dan

Disk Antibiotik	Luas Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori* (S/I/R)
Penicillin		
Spectinomycin		
Tetracyclin		
Nalidixic Acid		
Ciprofloxacin		
Ceftriaxone		

*Penentuan Kategori menggunakan acuan CLSI, S: Sensitif; I: intermediet; R: Resisten

7.5. EVALUASI

- 1) Jelaskan karakteristik morfologi, hasil pewarnaan Gram, dan media pertumbuhan yang digunakan untuk *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Buatlah diagram alur proses identifikasi *Neisseria gonorrhoeae* dari spesimen swab hingga interpretasi hasil.

Tabel 26

Penilaian Topik Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Genitalia

komotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil pewarnaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Kualitas preparat bagus 2. Interpretasi hasil pewarnaan dapat dibedakan jelas, y.i merah untuk Gram negatif dan ungu untuk Gram Positif 3. Bentuk dan susunan bakteri nampak jelas 4. Tidak ada endapan cat
Hasil	Memenuhi 1	Memenuhi 2	Memenuhi 3 kriteria	Memenuhi seluruh

identifikasi	<p>kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar 	<p>kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pembacaan mikroskopis dan makroskopis 2. Melakukan uji katalase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 3. Melakukan uji koagulase dan pembacaannya untuk bakteri Gram positif kokus 4. Melakukan penarikan kesimpulan identifikasi dengan benar
Hasil uji resistensi antibiotik	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik 	<p>Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melakukan pengujian resistensi antibiotik dengan benar 2. Melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dibentuk oleh antibiotik
Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	<p>Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara 	<p>Peserta melakukan 3-4 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan 	<p>Peserta melakukan 5 perilaku secara benar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Menggunakan APD lengkap 2. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 3. Menjadga

		berurutan dan skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	skematis 3. Menjadga kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	kebersihan lingkungan kerja 4. Berlaku sopan dan santun 5. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kamampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Kemampuan dalam menjelaskan Media dan reagensia yang digunakan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menyebutkan media-media yang akan digunakan dengan benar 2. Mampu menjelaskan fungsi dari media-media yang digunakan 3. Mampu menjelaskan reagen-reagen yang diperlukan dalam uji biokimia 4. Mampu menjelaskan zat warna, penguat cat utama dan peluntur yang digunakan dalam cat Gram
Kemampuan dalam menjelaskan urutan prosedur pemeriksaan	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Mampu menjelaskan tahapan pengambilan dan

secara berurutan	<p>pengambilan dan penanganan sampel dengan benar</p> <p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>pengambilan dan penanganan sampel dengan benar</p> <p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>dan penanganan sampel dengan benar</p> <p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>	<p>penanganan sampel dengan benar</p> <p>2. Mampu menjelaskan tahapan prosedur pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri penyebab infeksi kulit</p> <p>3. Mampu menjelaskan tahapan pewarnaan Gram secara berurutan dan benar</p> <p>4. Mampu menjelaskan tahapan uji resistensi antibiotik dan cara pembacaannya</p>
------------------	--	--	--	--

7.6. RINGKASAN

Neisseria gonorrhoeae adalah bakteri penyebab gonore, infeksi menular seksual yang menyerang mukosa genital dan rektal. Diagnosis laboratorium melibatkan pewarnaan Gram dari swab urogenital, kultur pada media selektif Thayer-Martin, serta uji oksidase dan fermentasi gula. Hasil positif menunjukkan diplokokus Gram negatif, oksidase positif, dan hanya memfermentasi glukosa. Ketepatan pengambilan dan penanganan spesimen sangat penting untuk hasil diagnosis yang akurat.

7.7. GLOSARIUM

- Diplokokus : Bakteri berbentuk bulat berpasangan.
- Thayer-Martin : Media selektif khusus untuk isolasi *Neisseria sp.*
- Fermentasi : Proses penguraian gula oleh mikroorganisme.
- Oksidase : Enzim yang menunjukkan aktivitas pernapasan aerobik.

Gram-negatif : Bakteri dengan dinding sel tipis, tidak mempertahankan warna kristal violet.

7.8. DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2021). *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (28th ed.). McGraw-Hill Education.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2022). *Sherris Medical Microbiology* (7th ed.). McGraw-Hill Education.
- World Health Organization. (2016). *Laboratory Diagnosis Of Sexually Transmitted Infections, Including Human Immunodeficiency Virus*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241549400>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Gonorrhea – Laboratory Testing Guidelines*. <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab.htm>
- Cheesbrough, M. (2017). *District Laboratory Practice In Tropical Countries* (2nd ed.). Cambridge University Press.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing* (28th ed., CLSI supplement M100). CLSI.

BAB VIII DIAGNOSTIK MOLEKULER

8.1. TUJUAN PEMBELAJARAN

Tujuan pembelajaran pada topik ini adalah :

- 1) Mahasiswa mampu memahami prinsip preparasi sampel
- 2) Mahasiswa mampu melakukan prosedur preparasi sampel
- 3) Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil dari preparasi sampel

8.2. PENDAHULUAN

Preparasi sampel merupakan tahap awal yang sangat penting dalam pemeriksaan biologi molekuler karena menentukan kualitas hasil akhir analisis. Dalam konteks mikrobiologi, preparasi sampel bakteri bertujuan untuk memperoleh bahan biologis (DNA atau RNA) yang murni, utuh, dan bebas dari kontaminasi. Tahap ini melibatkan panen sel bakteri dari media kultur, pencucian sel untuk menghilangkan sisa-sisa media dan zat pengganggu, serta pelisisan sel untuk mengeluarkan materi genetik. Prosedur ini harus dilakukan dengan steril dan hati-hati agar hasil ekstraksi dapat digunakan untuk aplikasi molekuler seperti PCR, elektroforesis, atau sekuensing.

Sel bakteri memiliki struktur dinding yang kompleks, terutama pada bakteri Gram Positif yang mengandung lapisan peptidoglikan tebal. Oleh karena itu, proses lisis sel harus dilakukan menggunakan kombinasi bahan kimia seperti detergen (SDS), enzim seperti lisozim, atau metode fisik seperti pemanasan dan sonikasi. Lisis sel ini bertujuan untuk menghancurkan dinding dan membran sel agar DNA atau RNA dapat dilepaskan ke luar sel. Tahap ini juga harus diikuti dengan pemisahan kontaminan seperti protein dan lipid, yang dapat mengganggu aktivitas enzim dalam reaksi molekuler.

Kontaminasi merupakan salah satu tantangan utama dalam preparasi sampel untuk biologi molekuler. Zat-zat pengganggu seperti residu media kultur, protein, dan RNase dapat menurunkan efisiensi reaksi PCR atau menyebabkan degradasi asam nukleat. Tahap pencucian dengan larutan buffer seperti PBS (*Phosphate Buffered Saline*) atau enzim lisozim penting untuk memastikan bahwa sel yang akan dilisiskan berada dalam kondisi bersih. Selain itu, penggunaan alat-alat yang steril dan bebas nuklease sangat penting untuk mencegah degradasi DNA/RNA selama proses

preparasi berlangsung.

Kualitas sampel yang baik sangat mempengaruhi keberhasilan pemeriksaan molekuler. Sampel yang tidak dipreparasi dengan baik dapat menghasilkan DNA yang terfragmentasi, RNA yang rusak, atau hasil PCR yang negatif palsu. Oleh sebab itu, standar operasional prosedur (SOP) dalam preparasi sampel harus ditegakkan secara ketat. Dengan teknik preparasi yang tepat, sampel bakteri akan siap digunakan dalam berbagai aplikasi molekuler, seperti identifikasi patogen, analisis ekspresi gen, deteksi mutasi, atau filogenetik.

8.3. PROSEDUR KERJA

8.3.1. Tahap Pra Analitik

a) Tujuan, Metode, prinsip dan kriteria sampel

1) Tujuan tahap pra analitik

Menyiapkan sampel bakteri yang optimal untuk pemeriksaan biologi molekuler seperti PCR, ekstraksi DNA, atau sekuensing, dengan menjaga integritas DNA dan mencegah kontaminasi silang.

2) Metode

Preparasi menggunakan teknik sentrifugasi, suspensi ulang, dan pelisisan awal dengan bahan kimia atau enzimatis untuk mempermudah ekstraksi DNA atau RNA.

3) Prinsip

Preparasi melibatkan pemisahan sel bakteri dari media kultur, pembersihan dari debris atau kontaminan, dan persiapan sampel dalam bentuk pellet atau lisat yang sesuai untuk pemeriksaan molekuler lanjutan.

4) Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel

- i. Kultur bakteri murni dari media cair atau padat.
- ii. Kultur segar (<24 jam), bebas kontaminasi, fase pertumbuhan log (eksponensial) untuk hasil DNA maksimal.

b) Persiapam alat dan bahan

Alat

- 1) Mikropipet,
- 2) Tabung mikro 1.5 mL,
- 3) Sentrifus,
- 4) Vortex,

- 5) Laminar air flow.

Bahan

- 1) Kultur bakteri,
- 2) Buffer lisis (lisozim)
- 3) Etanol 70%.

8.3.2. Tahap Analitik

a) Prosedur kerja

1) Persiapan koloni bakteri

- a. Tumbuhkan satu koloni bakteri dalam 15 ml BHI, diinkubasi pada suhu 37°C semalam
- b. 15 ml suspensi bakteri disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm, 15 menit pada suhu 4°C

2) Gram Positif

- a. Sel disuspensi dalam 480 μ l 50 mM EDTA.
- b. Ditambahkan 120 μ l enzim lisozim.
- c. Diinkubasi 37°C selama 30-60 menit.
- d. Disentrifus selama 2 menit percepatan 13000-16000 rpm dan supernatant dibuang.
- e. Lanjut ke step lisis sel dengan menggunakan sampel pellet yang didapatkan.

Gram negatif

- a. Lanjut ke step lisis sel

b) Nilai Normal

- 1) Terbentuk pellet bakteri padat dan bersih.
- 2) Tidak terdapat sisa media atau kontaminan di atas pellet.

c) Nilai Kritis

- 1) Tidak terbentuk pellet → kemungkinan konsentrasi bakteri rendah atau kesalahan prosedur.
- 2) Kontaminasi silang → jika dilakukan di luar area steril.

d) Perhitungan

Tidak ada perhitungan numerik langsung, namun dapat diukur OD600 (kepadatan optik) jika diperlukan untuk standarisasi jumlah sel.

8.3.3. Tahap Pasca Analitik

- a) Pelaporan hasil
 - 1) Sampel berhasil dipreparasi bila pellet terbentuk dan bersih.
 - 2) Dilaporkan dalam bentuk: status kebersihan, volume, dan penyimpanan
- b) Sumber kesalahan pemeriksaan
 - 1) Pipet tidak akurat → volume tidak sesuai
 - 2) Sentrifugasi tidak cukup → pellet tidak terbentuk
 - 3) Kurangnya kebersihan → kontaminasi silang
- c) Jaminan mutu pemeriksaan
 - 1) Gunakan kultur murni
 - 2) Lakukan semua tahap di area steril (*laminar air flow*)
 - 3) Gunakan alat steril dan sekali pakai
 - 4) Catat setiap tahap persiapan dan simpan sampel dengan label yang jelas.

8.4. LAPORAN PRAKTIKUM

Identitas Sampel :

1. Tujuan :

.....
.....
.....
.....

2. Alat dan Bahan

a. Alat :

.....
.....
.....
.....
.....

b. Bahan

.....
.....
.....

3) Bagaimana prinsip dasar preparasi sampel ?

Tabel 27

Rubrik Penilaian Praktikum Topik Diagnostik Molekuler

Psikomotorik (Lembar Observasi Psikomotorik)				
Deskripsi	1	2	3	4
Hasil Preparasi Sampel	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Menggunakan APD 2. Pipet sesuai volume 3. Tidak ada kontaminasi 4. Sampel siap digunakan untuk PCR	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Menggunakan APD 2. Pipet sesuai volume 3. Tidak ada kontaminasi 4. Sampel siap digunakan untuk PCR	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Menggunakan APD 2. Pipet sesuai volume 3. Tidak ada kontaminasi 4. Sampel siap digunakan untuk PCR	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Menggunakan APD 2. Pipet sesuai volume 3. Tidak ada kontaminasi 4. Sampel siap digunakan untuk PCR
Afektif (Attitude)				
Deskripsi	1	2	3	4
Berperilaku profesional	Peserta tidak melakukan pemeriksaan sama sekali	Peserta melakukan 1-2 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Menjaga area kerja tetap steril 3. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 4. Menjaga kebersihan lingkungan kerja 5. Berlaku sopan dan santun 6. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 3-5 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Menjaga area kerja tetap steril 3. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 4. Menjaga kebersihan lingkungan kerja 5. Berlaku sopan dan santun 6. Menjalankan prosedur K3 dengan baik	Peserta melakukan 5 perilaku secara benar: 1. Menggunakan APD lengkap 2. Menjaga area kerja tetap steril 3. Melakukan prosedur pemeriksaan secara berurutan dan skematis 4. Menjaga kebersihan lingkungan kerja 5. Berlaku sopan dan santun 6. Menjalankan prosedur K3 dengan baik
Kognitif (Kemampuan berfikir, pemahaman dan pengetahuan)				
Deskripsi	1	2	3	4
Pemahaman media, reagen, dan prinsip preparasi DNA untuk PCR	Memenuhi 1 kriteria sebagai berikut: 1. Menyebutkan alat dan bahan 2. Menjelaskan	Memenuhi 2 kriteria sebagai berikut: 1. Menyebutkan alat dan bahan	Memenuhi 3 kriteria sebagai berikut: 1. Menyebutkan alat dan	Memenuhi 4 kriteria sebagai berikut: 1. Menyebutkan alat dan bahan 2. Menjelaskan

	fungsi buffer lisis, etanol, dan enzim 3. Menjelaskan proses isolasi DNA 4. Menjelaskan prinsip PCR dan pentingnya kemurnian DNA	2. Menjelaskan fungsi buffer lisis, etanol, dan enzim 3. Menjelaskan proses isolasi DNA 4. Menjelaskan prinsip PCR dan pentingnya kemurnian DNA	bahan 2. Menjelaskan fungsi buffer lisis, etanol, dan enzim 3. Menjelaskan proses isolasi DNA 4. Menjelaskan prinsip PCR dan pentingnya kemurnian DNA	fungsi buffer lisis, etanol, dan enzim 3. Menjelaskan proses isolasi DNA 4. Menjelaskan prinsip PCR dan pentingnya kemurnian DNA
--	--	---	--	--

8.6. RINGKASAN

Preparasi sampel merupakan tahap awal yang sangat penting dalam pemeriksaan biologi molekuler karena kualitas hasil akhir sangat bergantung pada tahap ini. Pada pemeriksaan mikrobiologi molekuler, preparasi sampel bertujuan untuk memperoleh DNA bakteri yang murni, utuh, dan bebas kontaminasi. Proses ini mencakup panen sel bakteri dari media kultur, pencucian untuk menghilangkan sisa media, serta pelisisan menggunakan bahan kimia, enzim, atau metode fisik untuk melepaskan DNA. Dalam praktiknya, prosedur harus dilakukan secara steril dan hati-hati, terutama karena struktur dinding sel yang kompleks seperti pada bakteri Gram positif membutuhkan perlakuan khusus seperti penambahan lisozim. Sampel yang dipreparasi dengan baik akan menghasilkan pellet bersih, bebas debris, dan siap digunakan dalam PCR atau analisis molekuler lainnya. Kesalahan teknis seperti kontaminasi, pipet yang tidak akurat, atau sentrifugasi yang kurang optimal dapat memengaruhi hasil secara signifikan, sehingga SOP harus ditegakkan secara ketat sejak tahap pra-analitik hingga pelaporan hasil.

8.7. GLOSARIUM

- DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
 RNA : *Ribonucleic Acid*
 SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*.
 PBS : *Phosphate Buffered Saline*
 SOP : *Prosedur Operasional Standar*

8.8. DAFTAR PUSTAKA

- Banadaki, M. D. (2025). Simplified Molecular Diagnostics Methods For Environmental Testing Of Patogens And Other. *Kentucky*.
- Fatchiyah. (2018). *Buku Praktikum Teknisi Analisis Biologi Molekuler*. 1–49.
- Kim, D., Vanderbilt, C. M., Yang, S. R., Nandakumar, S., Nafa, K., Feratovic, R., Rekhtman, N., Rijo, I., Casanova, J., Yun, A., Brannon, A. R., Berger, M. F., Ladanyi, M., Lin, O., & Arcila, M. E. (2025). Maximizing the clinical utility and performance of cytology samples for comprehensive genetic profiling. *Nature Communications* , 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55456-8>
- Lemes, C. C., Germano da Silva, A., Ribeiro, D. A., & Malinverni, A. C. de M. (2024). Challenges and solutions in FISH for formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A scoping review. *Microscopy Research and Technique*, September 2024, 270–278. <https://doi.org/10.1002/jemt.24702>
- Maksum, I. P., Sriwidodo, Gaffar, S., Hassan, K., Subroto, T., & Soetisojo Soemitro. (2019). Buku Teknik Biologi Molekular. In *Alqaprint* (Issue September).
- Nanda, P. (2022). *Biologi Molekuler* (Issue October). <https://www.researchgate.net/publication/372134006>
- Randolph, C. E., Walker, K. A., Yu, R., Beveridge, C., Manchanda, P., & Chopra, G. (2025). Glial Biologist’s Guide to Mass Spectrometry-Based Lipidomics: A Tutorial From Sample Preparation to Data Analysis. *Glia*, 474–494. <https://doi.org/10.1002/glia.24665>
- You, Y., Yu, X., Jiang, J., Chen, Z., Zhu, Y. X., Chen, Y., Lin, H., & Shi, J. (2025). Bacterial cell wall-specific nanomedicine for the elimination of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* through electron-mechanical intervention. *Nature Communications* , 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58061-5>