

## **JUDUL KETERAMPILAN: PEWARNAAN, MORFOLOGI BAKTERI DAN JAMUR**

**Penulis: Dr. dr. Irma Suswati, M.Kes**

### **I. Tingkat Kompetensi Keterampilan**

Berdasarkan standar kompetensi dokter yang ditetapkan oleh KKI tahun 2020, maka tingkat kompetensi pemeriksaan pewarnaan, morfologi bakteri dan jamur adalah seperti yang tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. Tingkat kompetensi ketrampilan pemeriksaan pewarnaan (KKI, 2020)

<b>Jenis ketrampilan</b>	<b>Tingkat kompetensi</b>
1. Pewarnaan Gram, Spora, KOH/LPCB, Giemsa	4

#### **Keterangan:**

Tingkat kemampuan 1 Mengetahui dan Menjelaskan

Tingkat kemampuan 2 Pernah Melihat atau pernah didemonstrasikan

Tingkat kemampuan 3 Pernah melakukan atau pernah menerapkan di bawah supervisi

Tingkat kemampuan 4 Mampu melakukan secara mandiri

### **II. Tujuan Belajar**

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tentang pemeriksaan pewarnaan Gram, Spora, KOH/LPCB, Giemsa mulai dari persiapan alat dan bahan, melakukan prosedur pewarnaan pada mikroba
2. Mahasiswa mampu menjelaskan prosedur dan kaidah pewarnaan Gram, Spora, KOH/LPCB, Giemsa
3. Mahasiswa mampu menginterpretasikan hasil pewarnaan Gram, Spora, KOH/LPCB, Giemsa

### **III. Prerequisite knowledge**

Sebelum memahami konsep pemeriksaan pewarnaan pada mikroba, mahasiswa harus:

1. Memahami tentang morfologi dan struktur bakteri dan jamur

2. Memahami tentang prosedur pewarnaan dan hasil pewarnaan terhadap struktur bakteri dan jamur
3. Mampu menginterpretasikan hasil pewarnaan sebagai salah satu cara mengidentifikasi bakteri dan jamur

#### IV. Kegiatan Pembelajaran

Pembelajaran dilakukan dalam prosedur sebagai berikut:

Prosedur pembelajaran	Lama	Metode	Pelaksana/ Penanggung Jawab
Pre-tes	10 menit	Essay	Asisten laboran
Penjelasan prosedur pewarnaan dan interpretasinya	15 menit	Praktikum virtual	Dosen
Menjelaskan persiapan alat dan bahan pewarnaan	10 menit	Praktikum virtual	Mahasiswa
Menjelaskan pelaksanaan pewarnaan mikroba dengan pewarnaan Gram, Spora, KOH/LPCB, Giemsa	50 menit	Praktikum virtual	Mahasiswa
Menjelaskan hasil pewarnaan dan interpretasinya	15 menit	Praktikum virtual	Laboran/dosen
Post-tes	10 menit	Essay	Asisten laboran
Membuat laporan praktikum	50 menit	Mandiri	Mahasiswa

#### V. Sumber belajar

##### a. Morfologi dan Struktur bakteri dan jamur

Morfologi bakteri berdasarkan bentuk:

- Batang/bacil
- Bulat/coccus
- Spiral

Perubahan warna pada bakteri dipengaruhi lapisan dari dinding sel

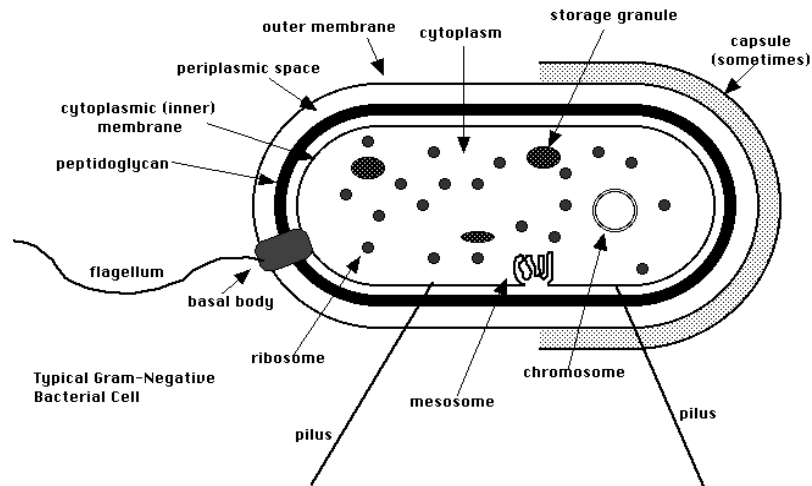
Bakteri bentuk Batang Gram positif : *Clostridium sp*, *Bacillus sp*, *Corynebacterium sp* dll

Bakteri bentuk Batang Gram negatif : *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *E.coli sp*, *Pseudomonas sp* dll

Bakteri bentuk Coccus Gram positif : *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*

Bakteri bentuk Coccus Gram negatif : *Nisseria sp*, *Moraxella sp*

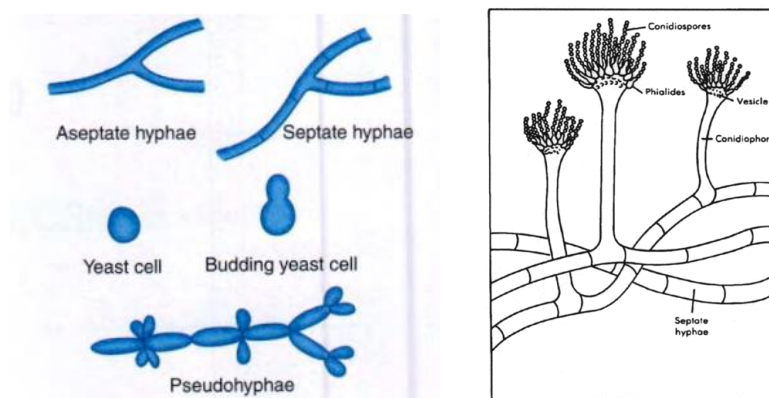
Struktur bakteri



Gambar 1. Struktur Bakteri (Murray, 2016)

Morfologi jamur

- Moulds/filamentous
- Yeast/unicellular
- Dimorfik



Gambar 2. Morfologi dan Struktur Jamur (Baveja, 2017)

Jamur mold: *Malasszia furfur*, *Exophilia wernnickii*, dll

Jamur yeast: *Candida sp* dll

## **b. Pewarnaan**

### Pewarnaan Gram dan interpretasi

- Hasil pewarnaan Gram positif berwarna ungu : dinding sel bakteri menyerap warna kristal violet karena dinding sel tebal mengandung peptidoglikan
- Hasil pewarnaan Gram negatif, berwarna merah : dinding sel bakteri menyerap warna safranin karena dinding sel tipis dan mengandung lipopolisakarida, fosfolipid dan lipoprotein

### Pewarnaan Spora dan interpretasi

- Hasil pewarnaan Spora positif berwarna hijau : bakteri memiliki spora menyerap warna malacite green
- Hasil pewarnaan Spora negatif berwarna merah : bakteri tidak memiliki spora dan badan bakteri menyerap warna safranin

### Pewarnaan KOH/LPCB dan interpretasi

- Hasil pewarnaan KOH pada jamur ditemukan gambaran hifa, konidia atau spora, budding

### Pewarnaan Giemsa

- Hasil pewarnaan Giemsa pada jamur atau bakteri ditemukan morfologi jamur atau bakteri yang lebih jelas, detail dan berwarna violet, selain itu bisa juga digunakan untuk melihat perubahan sel seperti giant sel, inclusion body

## **Panduan Tata Cara Pewarnaan.**

### **Pewarnaan**

Pewarnaan pada kuman merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi kuman penyebab penyakit. Bakteri dapat diwarnai oleh karena bakteri pada pH 7 (*negative charge*) dapat menangkap bahan warna (*positif charge/basic dyes*) seperti crystal violet, methylene blue, dan safranin. Cara pewarnaan lainnya bakteri tidak diwarnai yang diwarnai adalah latar belakangnya dan dikenal sebagai *negative staining*.

### Pembuatan Sediaan (smear)

Sediakan :

- Gelas obyek
- Ose
- Aquadest steril
- Bunsen

Cara :

- a. Bersihkan gelas obyek dengan kapas, kemudian lewatkan di atas api atau alkohol untuk menghilangkan lemak, kemudian biarkan dingin.
- b. Siapkan ose, setiap menggunakan ose dipanaskan terlebih dahulu di api bunsen dan dinginkan
- c. Buat sediaan **tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis** dengan cara:
  - Biakan padat : panaskan ose ambil aquadest steril dan teteskan satu ose pada gelas obyek, kemudian ambil dengan ose yang telah dipanaskan kuman padat sedikit dan suspensikan dengan aquadest di gelas obyek dan ratakan.
  - Biakan cair : panaskan ose ambil satu ose kuman dan teteskan pada gelas obyek dan ratakan.
  - Biarkan sediaan kering di udara, setelah kering lakukan fiksasi dengan cara lewatkan sediaan di atas api sebanyak 3x dan sediaan siap diwarnai.

### Pewarnaan Gram

















Tujuan pewarnaan Gram untuk melihat morfologi bakteri dan sifat pewarnaan kuman, bahan warna yang digunakan Kristal violet, Lugol, Alkohol 96 %, Safranin

Sediakan:

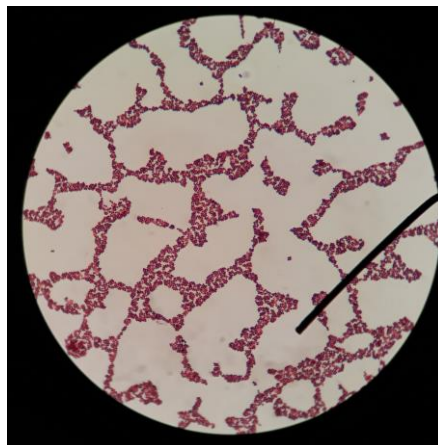
- Biakan kuman berbentuk batang dan kokus
- Bahan pewarna untuk pewarnaan Gram
- Gelas Obyek & Ose
- Aquades Steril
- Air
- Kertas penghisap

Cara:

- Buatlah sediaan (smear) kuman pada gelas obyek
- Tuangi sediaan dengan Kristal violet selama 1 menit, buang sisa Kristal violet dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit, buang sisa Lugol dan bilas dengan air
- Tuangi sediaan dengan Alkohol 96 % selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur dan buang sisa Alkohol dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan Safranin selama ½ menit, buang sisa safranin dan bilas dengan air
- Keringkan sediaan menggunakan kertas penghisap
- Lihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi)

Step	Microscopic Appearance of Cell		Chemical Reaction in Cell (very magnified view)	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
1 Crystal violet (primary dye)				
2 Gram's iodine (mordant)				
3 Alcohol (decolorizer)				
4 Safranin (red dye counterstain)				

Gambar 3. Tahap Pewarnaan Gram



Gambar 4. Pewarnaan Gram (Coccus Gram +)



Gambar 5. Pewarnaan Gram (Batang Gram +)

### **Pewarnaan Spora**

Merupakan pewarnaan khusus, tujuan pewarnaan Spora untuk melihat morfologi kuman terutama spora. Bahan warna yang digunakan : Malachite green, Safranin Sediakan:

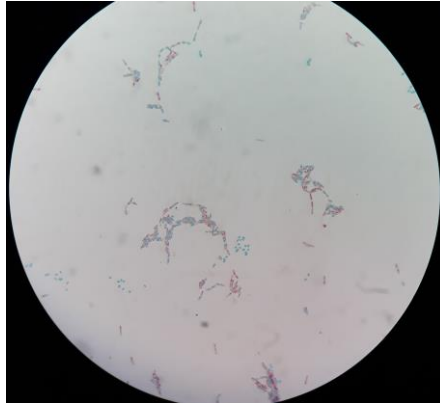
- Kuman pembentuk spora
- Bahan pewarna untuk pewarnaan spora metode Schaeffer Fulton
- Gelas obyek & ose
- Aquadest steril
- Air
- Kertas hisap

Cara Metode Schaeffer Fulton :

- a. Buatlah sediaan kuman pada gelas obyek.
- b. Tuangi sediaan dengan Malachite green dan panaskan selama 5 menit, dijaga jangan sampai mendidih dan kering. Buang sisa pewarna dan bilas dengan air.
- c. Tuangi sediaan dengan Safranin dan bilas dengan air.
- d. Keringkan sediaan dan lihat di bawah mikroskop. Lensa obyektif perbesaran 100x (beri 1 tetes minyak immersi)

Cara “modifikasi tahan asam”

- a. Caranya sesuai dengan cara pewarnaan tahan asam namun tanpa menggunakan alkohol asam



Gambar 7. Pewarnaan Spora

### **Pewarnaan Giemsa**

Praktikum ini bertujuan untuk mengidentifikasi morfologi jamur, bakteri dan sel (inclusion body atau giant sel) pada infeksi virus dan klamidia. Pada sel ragi dan jamur berfilamen akan berwarna violet/ungu sedangkan dinding sel dan septa tidak terlihat warna.

Sediakan:

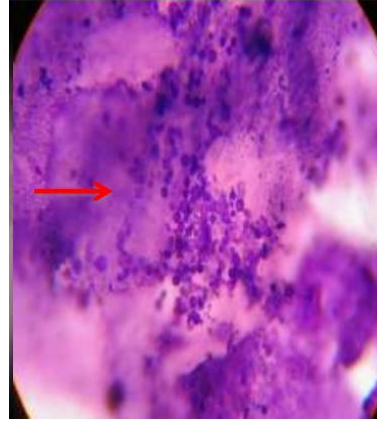
- Coplin jar
- Larutan giemsa
- Metil alcohol
- Etil alcohol 95%
- Aqua steril/buffer fosfat pH 7,2
- Pipet 1 ml

Cara:

- Slide yang berisi sediaan difiksasi terlebih dahulu dengan metil alcohol selama 5 menit
- 2 ml larutan giemsa diencerkan dengan 70 ml aqua steril atau diencerkan dengan buffer fosfat dengan perbandingan 1 (giemsa) : 7-10 (buffer)
- Letakkan sediaan di atas rak pewarnaan, kemudian dituangi dengan giemsa sampai menutup seluruh permukaan sediaan (15-30 menit)
- Cuci dengan air kran dengan cara menuangkan diatas sediaan sampai zat pewarna hilang



- Keringkan sediaan diatas rak pengering dengan cara kaca sediaan diletakkan dengan posisi miring dengan bagian yang diwarnai menghadap ke bawah untuk menghindari melekatnya debu dari udara



Gambar 8. Pewarnaan Giemsa (Ariyanti, 2017)

### **Pewarnaan KOH/LPCB**

Praktikum ini bertujuan untuk mempelajari cara-cara pemeriksaan jamur (human pathogen) secara sederhana.

Sediakan:

- Pembenihan *C.albicans* pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- Pembenihan jamur filamentous pada SDA
- Bahan warna Lacto Phenol Cotton Blue (LPCB)
- Bahan pemeriksaan : kerokan kulit/kuku/potongan rambut
- Larutan KOH/NaOH 10%.

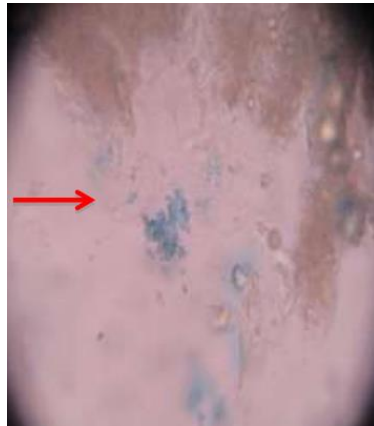
Cara :

### **Pemeriksaan Langsung Secara Mikroskopis**

Pada bahan pemeriksaan tertentu (kerokan kulit, kuku, potongan rambut), dibuat sebagai preparat **KOH/NaOH** kemudian diperiksa langsung dibawah mikroskop.

- Bahan pemeriksaan diletakkan pada gelas obyek.
- Teteskan 1 tetes KOH/NaOH 10 % pada bahan pemeriksaan tersebut dan tutuplah dengan gelas penutup.
- Panaskan diatas api spiritus dengan hati-hati.
- Setelah dingin, periksalah dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 10-40x dan intensitas sinar rendah.

- Perhatikan kemungkinan adanya sel *Yeast*, *budding cells*, *mycelium* atau *hyphae*.



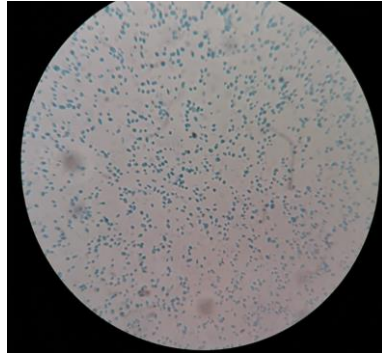
Gambar 9. Pewarnaan KOH (Ariyanti, 2017)

#### **Pewarnaan menggunakan LPCB**

- Bahan pemeriksaan dari kultur jamur filamentous diletakkan pada gelas obyek (atau dari preparat KOH/NaOH).
- Teteskan bahan warna LPCB pada gelas obyek tersebut dan tutup dengan gelas penutup. Periksa dibawah mikroskop dan perhatikan morfologinya (hifa bersepta atau tidak, spora).



Gambar 8. Pewarnaan LPCB (Mould)



Gambar 9. Pewarnaan LPCB (yeast)

### GERMINATING TUBE TEST

- Ambilah pembedihan *Candida sp.* Dengan ose dan masukkan kedalam tabung yang berisi serum mamalia.
- Inkubasikan pada 37°C selama  $\pm$  4 jam.
- Ambil kultur didalam serum tersebut menggunakan ose dan letakkan pada gelas obyek, tutup dengan gelas penutup. Periksa dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa obyektif perbesaran 40x.
- Carilah bentukan khas dari *Candida albicans* yaitu bentuk sel yeast dengan *Pseudohypha*.
- Untuk membantu pemeriksaan yeast, lakukan pewarnaan gram dari pembedihan yang telah disediakan

### PENILAIAN

Penilaian praktikum terdiri dari

- Rerata nilai pre-tes dan post tes (praktikum 1, 2, 3, 4, 5) =  $(0-100) \times 10\%$
- Rerata nilai laporan praktikum (praktikum 1, 2, 3, 4, 5) =  $(0-100) \times 10\%$
- Nilai ujian pewarnaan (1x ujian) =  $(0-100) \times 80\%$ 
  - Essay
  - Prosedural pewarnaan
  - Interpretasi hasil pewarnaan

### Ujian Ketrampilan Pewarnaan

Nama : .....

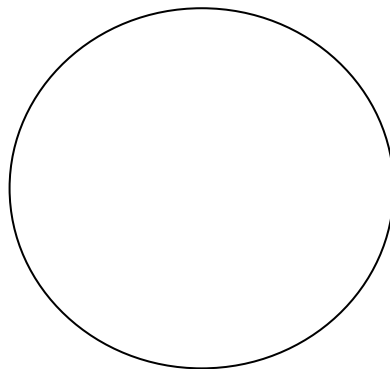
Nim : .....

Tanda tangan : .....

Jawablah soal dibawah ini :

Seorang pasien perempuan usia 20 th datang ke RS dengan keluhan nanah di lengan habis jatuh dari sepeda motor 3 hari yang lalu, awalnya bengkak, panas dan nyeri, sudah diberi betadine cair. Pemeriksaan fisik T 120/80 N 80x/mnt. RR 20x/mnt, teraba benjolan ukuran 2x2 cm, tidak berbatas tegas tampak kemerahan, fluktuasi dan tengah putih membentuk pustula. Dokter melakukan tindakan incisi abses dan mengirimkan spesimen berupa swab pus ke laboratorium, untuk identifikasi kuman dilakukan pengecatan gram dan tes katalase.

1. Tuliskan cara/prosedur pewarnaan GRAM (secara singkat)
  
2. Prosedural pengecatan Gram
3. Setelah dilakukan pengecatan GRAM pada spesimen tersebut,  
DESKRIPSIKAN SECARA LENGKAP MORFOLOGI sesuai dengan Gambar



4. Isilah secara singkat
  - a. Setelah itu di tes katalase (hasil NEGATIF). Kemungkinan pasien terinfeksi bakteri apa?  
.....
  - b. Kemungkinan pasien tersebut menderita penyakit apa? Sebutkan DIAGNOSA PENYAKIT nya  
.....

**DAFTAR PUSTAKA**

- Gerard J Tortora, Berdell R Funke, Christine J. Car, 2013. Microbiology: an introduction. Pearson.
- George F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. McGraw-Hill Professional Publishing, Universitas Michigan
- David Greenwood, Mike Barer, Richard Slack, Will Irving, 2012. Medical Microbiology eighteenth edition. Churchill Livingstone Elsevier Ltd.
- Ariyanti P, Hidayati AF, Suyoso S, 2017. Perbandingan Pemeriksaan *May Grunwald Giemsa* (MGG) dan *Potassium Hydroxide* (KOH) pada pasien *Malassezia folliculitis* di Unit Rawat Jalan Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Jurnal Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – *Periodical of Dermatology and Venereology* Vol 29 No 3.
- Murray P.R, Rosenthal KS, Pfaller MA, 2016. Medical Microbiology Eighth edition. Elsevier Inc. Canada