MODUL
PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI

Disusun Oleh:

Bagian Mikrobiologi

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG

2021

PENGANTAR

Modul pratikum Mikrobiologi ini berisi 5 (lima) ketrampilan yang harus diketahui oleh mahasiswa yaitu

1. Ketrampilan pewarnaan dan morfologi bakteri dan jamur
2. Ketrampilan persiapan, pemeriksaan sputum dan interpretasinya
3. Ketrampilan sensitivity antimikroba
4. Ketrampilan identifikasi *enterobacteriaceae*

Modul ini berisi tentang petunjuk umum kegiatan pelaksanaan praktikum di laboratorium Mikrobiologi FK UMM, tingkat kompetensi ketrampilan, tujuan belajar, *prerequisite knoeledge*, kegiatan pembelajaran, sumber belajar dan panduan tata cara praktikum.

Modul ini diharapkan memudahkan mahasiswa dalam melakukan kegiatan praktikum Mikrobiologi, selain prosedur praktikum modul ini juga dilengkapi dengan gambar-gambar sehingga mahasiswa lebih mengerti materi yang dipaparkan dalam modul ini.

Kami ucapkan terima asih pada semua pihak yang telah membantu dalam pembuatan dan penyusunan modul praktikum Mikrobiologi ini.

Malang, September 2021

Penyusun

PETUNJUK UMUM

Mikrobiologi adalah ilmu yang mempelajari kuman atau mikroba dalam ukuran yang sangat kecil. Mikroba yang dipelajari merupakan mikroba yang dapat menimbulkan penyakit.

Praktikum mikrobiologi ini perlu ketelitian dan bekerja dengan sebaik-baiknya sehingga sebelum melakukan praktikum persiapkan sebaik mungkin dengan membaca buku kuliah/buku pegangan (texbook) dan panduan praktikum.

Sebelum Praktikum

1. Siapkan : panduan praktikum, laporan praktikum, pensil warna
2. Pakailah baju praktikum dengan identitas nama pada dada sebelah kiri
3. Pakai masker dan handscoun sebelum dan selama praktikum
4. Persiapkan peralatan yang akan dipergunakan sesuai dengan topik praktikum dan periksa kelengkapan alat dan bahannya.
5. Jika peralatan dan bahan praktikum dalam keadaan tidak lengkap atau rusak laporkan pada Instruktur
6. Jika mahasiswa merusakkan peralatan praktikum, maka diwajibkan untuk mengganti alat tersebut

Selama Praktikum

1. Tidak diperbolehkan merokok, makan, atau memasukkan jari/benda-benda lain ke dalam mulut
2. Jika terjadi kecelakaan (luka kecil atau biakan kuman hidup tumpah) laporkan pada Instruktur.
3. Biakan kuman harus selalu di tutup apabila tidak di pakai
4. Sampah harus di buang di tempat sampah
5. Jika tidak dipakai matikan api spiritus/bunsen

Setelah Praktikum

1. Bersihkan mikroskop dengan kertas lensa atau kapas yang dibasahi dengan sedikit xylol
2. Peralatan (seperti; pipet, gelas obyek, swab) yang telah terpakai masukkan kedalam larutan Lysol
3. Masukkan mikroskop pada tempatnya sesuai dengan nomor mikroskop
4. Atur alat/bahan yang telah dipakai pada tempat yang telah di sediakan
5. Bersihkan meja praktikum

6. Cuci tangan setelah selesai memasukkan peralatan dan bahan pada tempatnya dengan sabun antiseptik
7. Dilarang membawa pulang biakan kuman

Laporan Hasil Praktikum

1. Catat hasil praktikum sementara pada panduan praktikum
2. Buat laporan praktikum pada buku laporan praktikum
3. Kumpulkan laporan praktikum sesuai dengan petunjuk Instruktur

PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI

Pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi bertujuan untuk mengidentifikasi kuman penyebab suatu penyakit infeksi. Agar hasil pemeriksaan akurat maka harus memperhatikan persyaratan dan prosedur pemeriksaan.

A. SPESIMEN (BAHAN PEMERIKSAAN)

Spesimen merupakan bahan yang akan diperiksa dan diambil sesuai gejala klinis yang diderita seorang pasien. Spesimen yang baik adalah spesimen yang dapat mewakili kuman penyebab penyakit infeksi.

Spesimen dapat berupa pus/sekret, darah, urin, sputum/dahak, feces, cairan cerebrospinal, cairan rongga dada, cairan sendi, hapusan hidung, tenggorok, rectum, vagina, ulkus/luka, dan lainnya tergantung gejala klinisnya.

Pada pengiriman bahan pemeriksaan, bahan harus dikirim sesegera mungkin, jika perlu bahan pemeriksaan dapat dimasukkan ke dalam medium trasport untuk menjaga agar bahan tidak kering.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam penerimaan bahan pemeriksaan adalah:

- Periksa label spesimen sudah sesuai dengan formulir permintaan dokter, misalnya nama penderita, nomor register, alamat, diagnosa klinis, macam spesimen yang dikirim, dan sebagainya.
- Spesimen yang di kirim representatif, misalnya : spesimen yang diperlukan sputum maka tidak representatif apabila yang di kirim adalah saliva (air liur).
- Cara penggambilan, pengiriman spesimen secara aseptis dan dengan cara yang benar

- Faktor lain yang dapat mempengaruhi kehidupan mikroorganisme/kuman, misalnya tempat penampungan spesimen mengandung bahan disinfektan.

B. CARA PENGAMBILAN DAN PENGIRIMAN SPESIMEN

Dalam menentukan diagnosa klinis dari penyebab suatu penyakit infeksi, diperlukan pengetahuan dan ketrampilan dalam cara-cara pengambilan, pengiriman dan pemeriksaan spesimen.

1) Bahan pemeriksaan swab tenggorok

Tujuan : untuk menegakkan diagnosa infeksi pada tenggorokan, misalnya Difteri, Pertusis, Infeksi oleh *Streptococcus sp*.

Bahan yang di sediakan:

- Spatel lidah
- Lidi kapas steril
- Medium Blood Agar Plate atau Chocolate Agar Plate
- Medium PAI atau Medium Loffler.

Cara Penggambilan:

a. Lidah dijulurkan dan ditekan menggunakan spatel lidah.
b. Usapkan lidi kapas pada daerah tenggorokan, sebaiknya pada tempat yang mengalami radang atau pada tempat yang terdapat bercak/membran/ pseudomembran.
c. Bahan pemeriksaan tersebut dipakai untuk pemeriksaan langsung dengan cara pewarnaan (Gram dan Neisser), serta ditanam pada medium perbenihan.

2) Bahan Pemeriksaan Darah

Tujuan : untuk menegakkan diagnosa beberapa penyakit, misalnya typhoid fever, Sub acut bacterial endocarditis, syndroma of septicaemia, atau febris yang tidak diketahui penyebabnya.

Bahan yang disediakan:

- Swab
- Larutan Iodium 2%
- Larutan Alkohol 70%
- Spuit dan jarum steril
- Medium biphasik pada botol /tabung

- Torniquet

Cara Pengambilan darah :

a. Pasang torniquet
b. Vena dipalpasi dari kulit diatasnya pada lengan bawah.
c. Permukaan kulit diolesi dengan iodium (gunakan kapas) dengan sedikit tekanan secara sirkuler dari tengah kearah luar.
d. Dengan cara yang sama tempat tersebut diolesi dengan alkohol dan hindari dari kekeringan.
e. Siapkan spuit dan jarum steril, suntikkan jarum pada vena.
f. Setelah darah teraspirasi ke dalam spuit lepaskan torniquet. Darah di ambil 10-20ml untuk dewasa, 5ml untuk anak dan bayi. Kemudian jarum dilepaskan dan pada tempat bekas suntikan diolesi dengan alkohol, dengan sedikit tekanan.
g. Darah di dalam spuit dipindahkan secara aseptis ke dalam botol/tabung yang mengandung medium perbenihan.Untuk menghindari kontaminasi perbenihan dengan udara, ujung botol dibakar di atas api bunsen dengan posisi miring, kemudian semprotkan darah dari spuit secara hati-hati.
h. Botol ditutup. Apabila tutupnya terbuat dari karet bersihkan dahulu dengan alkohol untuk menghindari kontaminasi.
i. Eramkan pada suhu 37 °C selama 21 hari.
j. Bahan pemeriksaan diperiksa setiap hari. Apabila terdapat pertumbuhan kuman dilakukan identifikasi.
k. Hasil biakan dikatakan negatif, apabila sampai 21 hari tidak didapatkan pertumbuhan kuman.

3) <u>Bahan Pemeriksaan Urin</u>

Tujuan : Untuk mengetahui adanya infeksi pada saluran kemih.

Bahan yang disediakan:

- Alat penampung urin (botol/tabung steril)
- Larutan PZ/saline
- Bahan pembersih/antiseptika, misalnya: sabun, deterjen, zephiran, air hangat steril.

Cara pengambilan:

a. Untuk Laki-laki: Ujung penis/uretra dibersihkan dengan PZ dan sabun bergantian, yang terakhir dengan air hangat steril. Aliran kencing pertama dibuang yang ditampung adalah aliran kencing bagian tengah (midstream urine)
b. Untuk perempuan: Vulva dan labial fold dibersihkan seperti pada laki-laki. Kencing dilakukan dengan berdiri dan yang ditampung adalah aliran kencing bagian tengah.
c. Untuk pengiriman bahan pemeriksaan urin, urin harus ditempatkan pada wadah steril dan dikirimkan ke laboratorium secepat mungkin.

4) Bahan Pemeriksaan Sekret Luka

Tujuan :Untuk mengetahui penyebab infeksi pada luka.

Bahan yang disediakan:

- Lidi kapas steril
- Kapas
- Larutan alkohol 70%

Cara pengambilan:

a. Bagian tepi luka dibersihkan dahulu dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%
b. Dengan hati-hati (jangan menyentuh bagian tepi luka) ambillah (swab) sekret luka dengan lidi kapas steril.
c. Ambillah dua kali dengan cara yang sama. Satu untuk pemeriksaan sedian langsung dan satu lagi untuk kulyur kuman.
d. Sebaiknya segera dilakukan pemeriksaan sebelum bahan pemeriksaan kering.Pengiriman bahan pemeriksaan sebaiknya dimasukkan ke dalam medium transport.

C. TATA LAKSANA PEMERIKSAAN

Sesudah spesimen diterima dan dicatat dalam buku penerimaan, selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan beberapa prosedur sebagai berikut:

1) **Sediaan Langsung (direct smear) dan pewarnaan**

Dibuat hapusan pada gelas obyek, kemudian dilakukan pewarnaan dan dilihat dibawah mikroskop.

- Pewarnaan rutin yang dilakukan adalah pewarnaan gram
- Pewarnaan tertentu dapat dilakukan tergantung diagnosa klinisnya seperti:
  - Pewarnaan metakromasi/neisser untuk penyakit Difteri
  - Pewarnaan tahan asam untuk penyakit TBC, Lepra
  - Pewarnaan Spora untuk penyakit Anthrax, Tetanus
- Dengan pewarnaan dapat diketahui morfologi kuman serta sifat kuman terhadap pewarnaan.

Pada spesimen tertentu dapat dibuat preparat basah tanpa pewarnaan, misalnya apabila kita ingin melihat kuman masih dalam keadaan hidup:

- Melihat pergerakan kuman metode Hanging drop method
- Melihat Leptospira menggunakan Darkfield microscope.

2) **Kultur (perbenihan kuman)**

Pada perbenihan dan isolasi primer kuman, dipakai medium perbenihan yang sesuai untuk pertumbuhannya, misalnya :

C. diphteriae : medium PAI,Loffler
M.tuberculosis : medium Lowenstein Jensen
N.gonorrhoe : medium Thayer Martin V C N
Streptococcus sp : medium Blood Agar Plate
D. pneumoniae : medium Chocolate Agar Plate
Enterobactericeae : Medium Mc Conkey, Eosin Methylene Blue

Setelah inokulasi/streaking pada medium perbenihan, kemudian medium dieramkan pada almari pengeram (inkubator) pada suhu optimum 35-37 C, selama 18-24 jam. Kuman-kuman tertentu pada pertumbuhannya memerlukan suasana anaerob, untuk itu untuk pertumbuhannya medium dimasukkan ke dalam anaerobic jar. Ada pula kuman yang memerlukan suasana CO_2 5-10% untuk pertumbuhannya, untuk itu medium dimasukkan kedalam candle jar. Apabila setelah pengeraman didapatkan pertumbuhan kuman (koloni), maka dapat dilanjutkan identifikasi kuman.

Identifikasi kuman diarahkan sesuai dengan morfologi yang ditemukan pada pemeriksaan sediaan langsung dan bentuk koloni warna koloni/pigmen pada medium pertumbuhan.

3) **Reaksi biokimia**

   Untuk membantu identifikasi kuman, dilakukan beberapa reaksi biokimiawi, misalnya tes fermentasi gula – guka, produksi indol, produksi urease.

4) **Tes Kepekaan kuman terhadap antibiotika/antimikroba**

   Tes ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu kuman penyebab penyakit peka terhadap antimikroba yang diujikan secara laboratories (in vitro). Tes ini sangat membantu klinisi dalam memberikan terapi.

5) **Reaksi serologis**

   Reaksi serologis diperlukan untuk menegakkan diagnosa suatu penyakit,misalnya: reaksi gumpal widal untuk menegakkan diagnosa penyakit Typhoid fever.

6) **Tes Virulensi/ keganasan kuman**

   Tes ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah kuman penyebab yang ditemukan itu bersifat patogen/toksigenik ataukah tidak.

   Tes ini dapat dilakukan secara:

   - In vitro misalnya tes koagulase kuman *Staphyloccus aureus*
   - In vivo menggunakan binatang percobaan (misal; kelinci, mencit, marmut) yang diinfeksi kuman. Pemilihan binatang percobaan didasarkan kepekaan binatang tersebut terhadap kuman yang diuji.

Hal lain yang perlu diingat dalam mengerjakan pemeriksaan mikrobiologis adalah setiap pemindahan atau pengambilan kuman dari medium ke medium lainnya harus dalam suasana yang aseptis, dimaksudkan untuk menghindari terjadinya kontaminasi.