



BUKU PENUNTUN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI BLOK 12 & 13



Penyusun:

dr. Herman Sunaryo, MS

Dr. dr. Wani D. Gunardi, Sp.MK (K)

Dra. Elisabeth D. Harahap, MS

Donna Mesina P, Ssi., M.Biomed

dr. Ade Dharmawan, Sp.MK

dr. Nicolas Layanto, Sp.MK

Departemen Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas Kristen Krida Wacana

2020



Buku Penuntun Praktikum Mikrobiologi

Blok 12 Infection & Immunity

Blok 13 Growth & Development

Penyusun :

dr. Herman Sunaryo, MS

Dra. Elisabeth D. Harahap, MS

Dr. dr. Wani Devita Gunardi, SpMK (K)

Donna Mesina Pasaribu, Ssi., M.Biomed

dr. Ade Dharmawan, SpMK

dr. Nicolas Layanto, SpMK

**DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI
FKIK UKRIDA
JAKARTA**

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Memakai baju praktikum (jas laboratorium) minimal setinggi lutut dan harus memakai sepatu tertutup.
2. Membawa pensil warna (minimal 12 warna)
3. Membawa buku Penuntun Praktikum Mikrobiologi
4. Dilarang membawa makanan/minuman ke dalam ruang laboratorium
5. Perhatikan nomor mikroskop yang digunakan masing-masing dan teliti kelengkapan mikroskop tersebut sebelum dipakai.
6. Seluruh bahan dan alat praktikum yang disediakan menjadi tanggung jawab kelompok masing-masing.
7. Menggunakan minyak emersi (cukup satu tetes) untuk pembesaran obyektif 100x
8. Lampu spiritus ditutup kembali bila tidak dipakai.
9. Bila biakan kuman tumpah atau pecah, segera lapor Dosen pembimbing dan bersihkan dengan lisol dan alkohol.
10. Setelah selesai praktikum, setiap kelompok diwajibkan untuk :
 - a. membersihkan kertas/kapas/korek api/ gelas alas/ kaca penutup gelas alas/ pipet/ pinset bekas pakai dan masukkan ke dalam mangkok berisi lisol yang telah disediakan.
 - b. membersihkan lensa obyektif 100 x dengan kapas + xylol dan matikan lampu mikroskop.
 - c. menyerahkan buku penuntun praktikum (hasil pengamatan) kepada dosen untuk ditandatangani.
 - d. membuang sampah pada tempatnya
 - e. mencuci tangan dengan sabun sebelum meninggalkan ruang laboratorium.

Blok 12 Infection & Immunity

PRAKTIKUM BLOK 12
(INFECTION & IMMUNITY)

Praktikum 1 :

Pewarnaan bakteri :

- A. Pewarnaan sederhana
- B. Pewarnaan Gram
- C. Pewarnaan khusus

Praktikum 2 :

- A. Cara mengasingkan bakteri
- B. Morfologi koloni bakteri
- C. Flora normal mulut, kulit dan udara
- D. Uji kepekaan bakteri terhadap desinfektan
- E. Uji kepekaan bakteri terhadap antibiotika

Praktikum 3 :

- A. Melihat gerak bakteri
- B. Uji biokimia
- C. Pemeriksaan imunologi penyakit infeksi

Mikrobiologi Kedokteran

Blok 12	: Infeksi and Imunitas
Praktikum	: 1
Topik	: Pewarnaan Bakteri: <ul style="list-style-type: none">➤ Pewarnaan Sederhana➤ Pewarnaan Gram➤ Pewarnaan Khusus
Pengampu	: Herman Sunaryo, dr. MS, Elisabeth Harahap, Dra, MS, Donna Mesina R.Pasaribu, S.Si., M.Biomed Wani Devita Gunardi, Dr., dr., Sp.MK (K) Ade Dharmawan, dr, Sp.MK Nicolas Layanto, dr, Sp.MK
Waktu	: 100 menit

Sasaran Belajar :

1. Memahami cara melakukan jenis-jenis pewarnaan yang digunakan untuk melihat morfologi sel bakteri secara mikroskopik
2. Memahami cara melakukan pewarnaan khusus untuk melihat bagian-bagian struktur bakteri dan memahami pewarnaan khusus sebagai salah satu cara untuk membedakan sifat-sifat bakteri terhadap zat warna.

Buku Wajib:

1. Jawetz, Melnick & Adelberg's. 2016. Medical Microbiology. 27thed. Mc Graw Hill Lange. New York.
2. Patrick Murray, *et al* . 2016. Medical Microbiology. 8th ed. Port Mosby, USA.
3. Goering RV, et al. Mims' Medical Microbiology. 5th ed. 2013. Elseviers

Referensi:

1. Mahon, *et al* . 2014. Texbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Wb. Saunders Company Philadelphia.
2. Bailey & Scott's, *et al* . 2016. Diagnostic Microbiology. 14th ed. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri.

Ringkasan:

Untuk melihat badan sel dan struktur sel bakteri, dilakukan dengan cara pewarnaan sederhana atau khusus. Bakteri mempunyai bentuk dan morfologi bulat (kokus), batang (basil), spiral (berlekuk) atau pleomorfik (tidak beraturan). Dengan pewarnaan Gram bakteri dibagi menjadi 2 sifat: bakteri positif Gram dan bakteri negatif Gram.

Self-assesment:

1. Jelaskan pewarnaan yang digunakan untuk melihat morfologi sel bakteri secara mikroskopik
2. Jelaskan cara melakukan pewarnaan Gram.
3. Jelaskan bentuk dan morfologi sel bakteri setelah diwarnai.

PEWARNAAN SEDERHANA

Pewarnaan bakteri dengan menggunakan satu zat warna. Hanya untuk melihat bentuk bakteri.

Zat warna yang biasa dipakai adalah biru metilen, air fukhsin dan ungu kristal karbol.

Cara kerja:

Membuat preparat :

1. Sediakan gelas alas yang bersih (dapat dibersihkan dengan kapas alkohol).
Kemudian lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak
Beri tanda dengan pinsil gelas pada bagian bawah preparat.
2. Ambil biakan bakteri, sebar secara merata di atas gelas alas.
Bila sediaan bakteri dalam perbenihan cair, maka diambil satu sengkeliit dan disebar di atas gelas alas. Bila sediaan bakteri pada perbenihan padat, maka diambil satu sengkeliit NaCl faal, letakkan pada gelas alas, kemudian ambil biakan bakteri dan buat suspensi dengan NaCl tadi.
3. Sediaan dibiarkan mengering di udara atau dapat dipercepat pengeringannya dengan menghangatkan di atas api.
4. Sediaan yang telah kering direkatkan dengan melewati di atas api kecil 2-3 kali. Selain dengan api kecil, perekatan dapat juga dilakukan dengan metil alkohol.
5. Letakkan sediaan di atas bak cuci, kemudian tuang zat warna, biarkan selama 1 – 2 menit.
6. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan di udara atau letakkan diantara dua lembar kertas saring sambil ditekan perlahan-lahan.
7. Teteskan minyak imersi di atas sediaan, periksa di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa okuler 10x dan objektif 100x.

Bahan :

1. Biakan bakteri :
 - *Bacillus sp.*
 - *Staphylococcus sp.*
 - *Vibrio sp.*
 - *Streptococcus sp.*

2. Zat warna :

- Ungu kristal karbol
- Air fukhsin

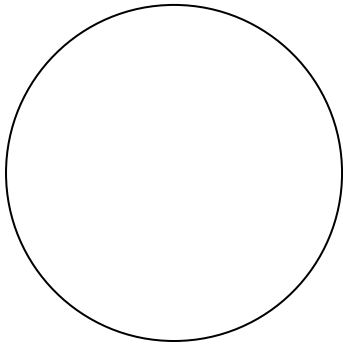
Tugas :

Buatlah pewarnaan sederhana dari *Bacillus*, *Streptococcus* dan *Vibrio* dengan zat warna ungu kristal karbol atau air fukhsin.

Gambar hasil pengamatan.

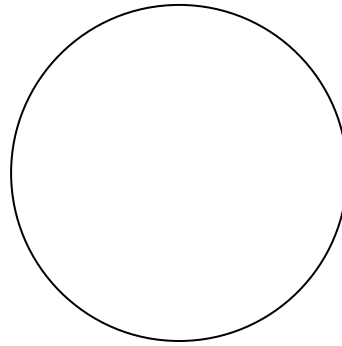
PEWARNAAN SEDERHANA

Bacillus subtilis



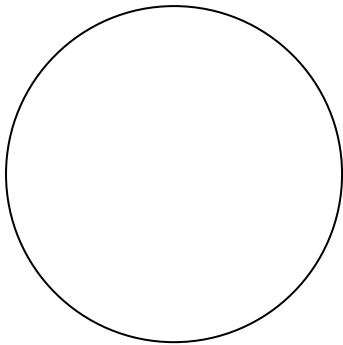
Bentuk bakteri:
Zat warna:

Streptococcus sp.



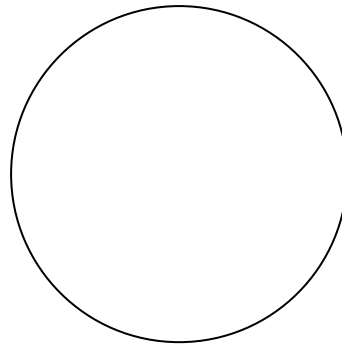
Bentuk bakteri:.....
Zat warna:

Staphylococcus aureus



Bentuk bakteri:
Zat warna:

Vibrio sp.



Bentuk bakteri:.....
Zat warna:

PEWARNAAN GRAM

Pewarnaan Gram adalah pewarnaan diferensial, yang membedakan bakteri dalam dua Golongan yaitu bakteri positif Gram yang mengikat zat ungu gentian dan bakteri negatif Gram yang melepaskan zat warna ungu gentian dan mengikat zat warna kedua yaitu air fukhsin. Pembagian golongan ini membedakan sifat-sifat bakteri.

Cara Kerja :

1. Buatlah sediaan pada gelas alas dan rekatkan.
2. Tuang larutan kristal violet, biarkan selama 1 menit
3. Cuci dengan air, sampai tidak ada zat warna yang mengalir.
4. Tuang cairan lugol, biarkan selama 1 menit
5. Cuci dengan air
6. Cuci dengan *decolorizer* (aseton + isopropanol) sampai tidak ada warna ungu yang mengalir dari sediaan (3 – 60 detik).
7. Cuci dengan air
8. Warnai dengan safranin selama 1 menit
9. Cuci dengan air dan keringkan

Hasil pewarnaan :

Bakteri positif Gram berwarna ungu

Bakteri negatif Gram berwarna merah

Bahan :

1. Biakan bakteri
 - a. *Staphylococcus aureus*
 - b. *Bacillus subtilis*
 - c. *Escherichia coli*
 - d. *Vibrio air*
2. Zat warna (Pewarnaan Gram BD)
 - a. Larutan kristal ungu
 - b. Larutan Iodine (lugol)

c. *Decolorizer* (Aceton + Isopropanol= 1:3)

d. Larutan Safranin

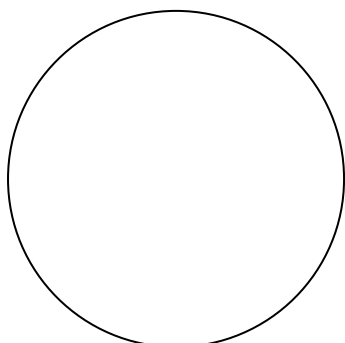
Tugas: Buatlah pewarnaan Gram bakteri berikut: *Staphylococcus aureus*,
Escherichia coli, *Bacillus subtilis*, *Vibrio sp.*
Gambar hasilnya !

Pertunjukkan:

Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio air*
Bacillus subtilis, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium tetani*.

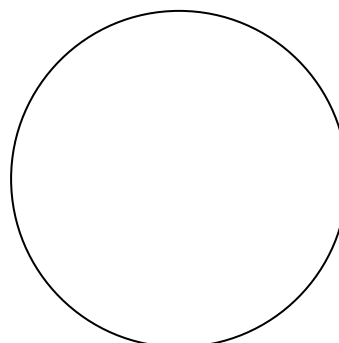
PEWARNAAN GRAM

Bacillus subtilis.



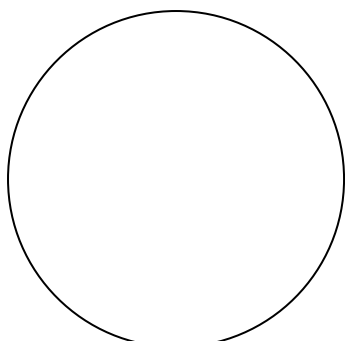
Bentuk kuman:
Sifat Gram:

Streptococcus pyogenes



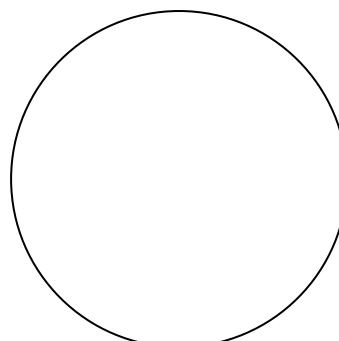
Bentuk kuman:.....
Sifat Gram:

Staphylococcus aureus



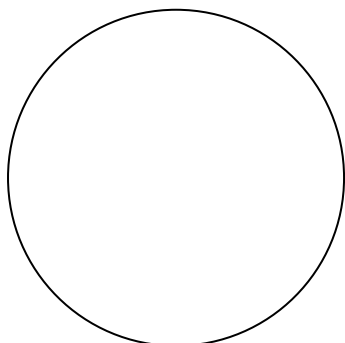
Bentuk kuman:
Sifat Gram:

Escherichia coli



Bentuk kuman:.....
Sifat Gram:

Vibrio sp.



Bentuk kuman:
Sifat Gram:

PEWARNAAN SIMPAI

Beberapa jenis bakteri mempunyai suatu lapisan semacam lendir di luar sel yaitu simpai atau kapsul. Kapsul dapat dilihat dengan pewarnaan khusus atau dengan mikroskop elektron. Salah satu pewarnaan untuk melihat kapsul/simpai adalah cara **Gins-Burri**.

Pewarnaan Gins-Burri

Cara kerja:

1. Teteskan satu tetes tinta bak pada ujung gelas alas.
2. Teteskan di sebelahnya satu tetes suspensi bakteri yang akan diperiksa.
3. Campurkan kedua tetesan tadi, kemudian dengan gelas alas yang lain dihapuskan sepanjang permukaannya, seperti membuat sediaan darah.
4. Keringkan dan rekatkan
5. Tuangkan fukhsin karbol 1/10, biarkan 1-2 menit
6. Cuci dengan air, lalu keringkan.

Hasil:

Badan bakteri berwarna merah

Simpai/kapsul tidak berwarna

Latar belakang hitam kemerah-merahan

Bahan:

1. Biakan bakteri : *Klebsiella ozaenae*
2. Zat warna :
 - a. Tinta bak
 - b. Fukhsin karbol 1/10

Tugas:

Buatlah pewarnaan Gins-Burri dari biakan *Klebsiella ozaenae*.

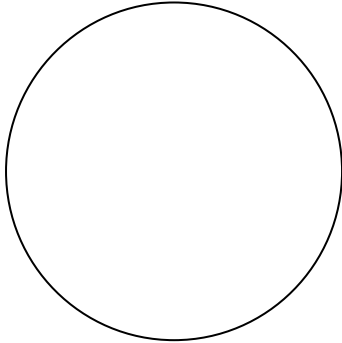
Gambar hasilnya.

Pertunjukkan:

Pewarnaan Gins-Burri dari: *Klebsiella ozaenae*, *Streptococcus pneumoniae*

PEWARNAAN SIMPAI

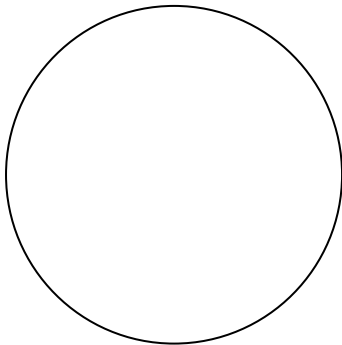
1. *Klebsiella ozaenae*



Pewarnaan

Keterangan gambar:

2. *Streptococcus pneumoniae*



Pewarnaan

Keterangan gambar:

PEWARNAAN SPORA

Spora tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan sederhana atau Gram, harus dengan pewarnaan khusus. Pewarnaan spora yang banyak dipakai adalah cara **Klein**.

Pewarnaan Klein:

Cara kerja:

1. Buatlah suspensi bakteri yang tebal dengan NaCl faal di dalam tabung, sehingga keruh menyerupai air susu.
2. Tambahkan fukhsin-karbol sama banyak
3. Panaskan dengan api kecil selama 6 menit (dalam penangas air 80°C selama 10 menit)
4. Buatlah sediaan pada gelas alas dari suspensi tadi, kemudian keringkan dan rekatkan.
5. Teteskan H₂SO₄ 1% selama 2-3 detik.
6. Cuci dengan air
7. Tuangkan air biru metilen, biarkan selama 2-4 menit.
8. Cuci dengan air dan keringkan.

Hasil pewarnaan:

Badan bakteri berwarna biru

Spora berwarna merah

Bahan:

1. Biakan bakteri berspora: *Bacillus sp.*
2. a. NaCl faal 1 ml
b. Fukhsin karbol
c. H₂SO₄ 1%
d. Air biru metilen

Tugas:

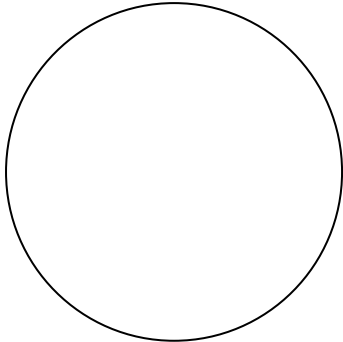
Buatlah pewarnaan Klein dari biakan bakteri berspora (berumur 1-2 hari) dan gambar hasilnya.

Pertunjukan:

1. *Clostridium tetani* dengan pewarnaan Gram (spora terminal)
2. Bakteri berspora dengan pewarnaan Gram (spora subterminal)
3. Bakteri *Bacillus anthracis* dengan pewarnaan Gram (spora sentral)

PEWARNAAN SPORA

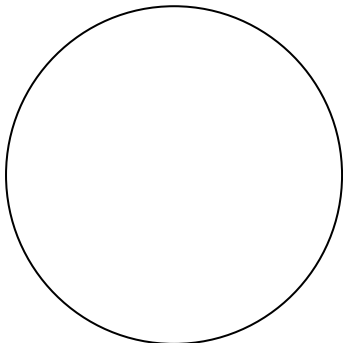
1. *Bacillus subtilis*.



Keterangan gambar:

- Pewarnaan:
- Letak spora:
- Badan kuman berwarna:
- Spora berwarna:

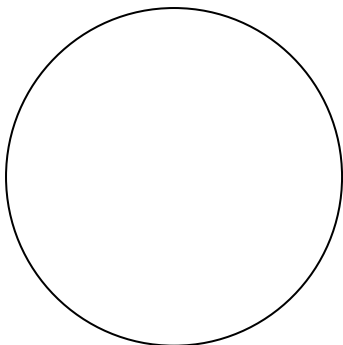
2. *Bacillus anthracis*



Keterangan gambar:

- Pewarnaan:
- Letak spora:
- Badan kuman berwarna:
- Spora berwarna:

3. *Clostridium tetani*.



Keterangan gambar:

- Pewarnaan:
- Letak spora:
- Badan kuman berwarna:
- Spora berwarna:

PEWARNAAN FLAGEL

Flagel tidak dapat dilihat dengan pewarnaan biasa (sederhana atau Gram). Untuk melihat flagel bakteri harus dengan pewarnaan khusus atau dengan mikroskop elektron. Salah satu pewarnaan flagel adalah menurut **Gray**.

Pewarnaan Gray:

Cara kerja:

1. Bakteri berflagel yang akan diperiksa harus berumur 8 jam dan sudah dipindah biakkan setiap hari selama 4 hari berturut-turut di dalam cairan embun (*condensed-water*) dari agar tabung.
2. Teteskan cairan embun tersebut ke atas gelas alas (jangan menggunakan sengkeliit), miringkan gelas alas agar tetesan tadi menyebar.
3. Biarkan kering di udara, kemudian rekatkan di atas api kecil 2 kali
4. Tuangkan larutan Beits, biarkan 7-10 menit
5. Cuci perlahan dengan air (biarkan air mengalir dari ujung gelas alas)
6. Tuangkan fukhsin-karbol, biarkan 5 menit
7. Cuci dengan air perlahan sampai bersih, keringkan di udara.

Hasil pewarnaan:

Flagel dan badan bakteri berwarna merah

Bahan:

1. Sediaan bakteri berflagel (*Proteus vulgaris* dan *Vibrio sp*)
2. Zat warna:
 - a. Larutan Beits (asam tanat + tawas + fukhsin)
 - b. Fukhsin-karbol

Tugas:

Buatlah pewarnaan Gray dari sediaan *Proteus/Vibrio*

Perunjukan:

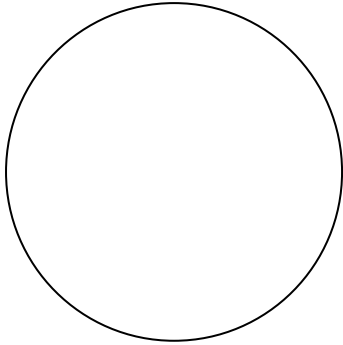
Vibrio sp dengan pewarnaan Gray (flagel monotrikh)

Proteus sp dengan pewarnaan Gray (flagel peritrikh)

Pseudomonas sp dengan pewarnaan Gray (flagel lofotrikh)

PEWARNAAN FLAGEL

1. *Vibrio sp.*

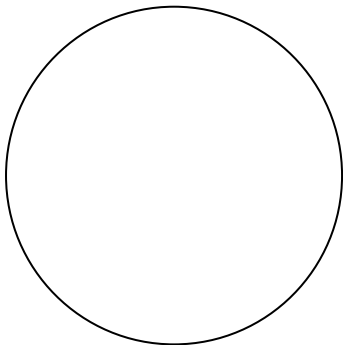


Keterangan gambar:

-Pewarnaan:

-Letak flagel:

2. *Proteus sp.*

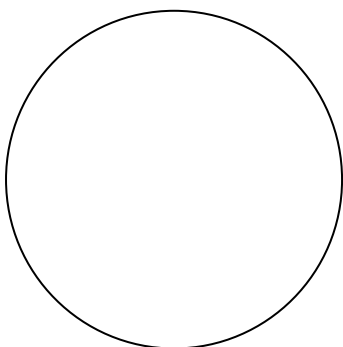


Keterangan gambar:

- Pewarnaan:

- Letak flagel:

3. *Pseudomonas sp.*



Keterangan gambar:

- Pewarnaan:

- Letak flagel:

PEWARNAAN BECKER-KRANTZ

Bakteri yang termasuk dalam golongan spirochaetes ukurannya sangat kecil, tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan biasa (Gram) harus dengan pewarnaan khusus misalnya pewarnaan Fontana Tribondeau, Becker-Krantz. Bakteri ini termasuk dalam familia Treponemataceae misalnya: Borrelia, Treponema dan Leptospira.

Genus Borrelia : Bentuk spiral pendek, mempunyai 3 – 5 lekukan tidak teratur.

Genus Treponema : Bentuk spiral, 10 – 12 lekukan teratur dengan kedua ujung lurus, Bergerak berputar menurut sumbu panjangnya.

Genus Leptospira : Bentuk spiral halus dengan kedua atau salah satu ujung bengkok seperti kait.

Pewarnaan Becker-Krantz

Cara kerja:

1. Sediaan dituangi larutan Ruge Ross selama 1 menit (setelah 0,5 menit dibuang dan diganti baru).
2. Dicuci dengan air
3. Tuang Beits tanin, panaskan sampai keluar uap selama 0,5 menit jangan sampai mendidih.
4. Dicuci dengan air
5. Warnai dengan ungu kristal karbol, panaskan selama 2 menit
6. Dicuci dengan air.
7. Keringkan di udara (jangan diantara kertas saring)

Hasil : Kuman berwarna ungu gelap.

Bahan :

1. Sediaan Leptospira
2. Pewarnaan Becker-Krantz
 - a. Larutan Ruge-Ross
 - b. Beitz tanin
 - c. Ungu kristal karbol

Pertunjukan: Pewarnaan Becker-Krantz dari Leptospira.

Mikrobiologi Kedokteran

Blok 12	: Infeksi dan Imunitas
Praktikum	: 2
Topik	: <ul style="list-style-type: none">➤ Cara Mengasingkan dan mengisolasi bakteri➤ Morfologi koloni bakteri➤ Flora normal mulut, kulit dan udara➤ Uji kepekaan bakteri terhadap desinfektan➤ Uji kepekaan bakteri terhadap antibiotika
Pengampu	: Herman Sunaryo, dr. MS, Elisabeth Harahap, Dra, MS, Donna Mesina R.Pasaribu, S.Si., M.Biomed Wani Devita Gunardi, Dr., dr., Sp.MK (K) Ade Dharmawan, dr, Sp.MK Nicolas Layanto, dr, Sp.MK
Waktu	: 100 menit

Sasaran Belajar :

1. Memahami cara mengasingkan dan mengisolasi bakteri dari spesimen klinik atau dari medium cair
2. Memahami morfologi koloni dan dapat membedakan bakteri berdasarkan ciri morfologi atau pigmen yang dihasilkan
3. Memahami cara mengisolasi flora normal tubuh, udara, tanah dan memahami jenis bakteri yang umumnya hidup sebagai flora normal.
4. Memahami cara melakukan desinfeksi kulit dan desinfeksi alat.
5. Memahami cara penentuan MIC dan MBC

Buku Wajib:

1. Jawetz, Melnick & Adelberg's. 2016. Medical Microbiology. 27thed. Mc Graw Hill Lange. New York.
2. Patrick Murray, *et al* . 2016. Medical Microbiology. 8th ed. Port Mosby, USA.
3. Goering RV, et al. Mims' Medical Microbiology. 5th ed. 2013. Elseviers

Referensi:

1. Mahon, *et al*. 2014. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Wb. Saunders Company Philadelphia.
2. Bailey & Scott's, *et al*. 2016. Diagnostic Microbiology. 14th ed. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri.

Ringkasan:

Mengasingkan dan mengisolasi bakteri dilakukan dengan menggores medium padat secara penipisan. Penipisan akan menghasilkan satu koloni yang terpisah dan dapat diidentifikasi morfologi koloninya dan identifikasi secara mikroskopik.

Flora normal tubuh pada kulit dapat diisolasi dengan meletakkan jari tangan atau permukaan kulit lainnya pada media agar darah, hasil isolasi umumnya bakteri *Staphylococcus*, sedangkan flora normal kotoran gigi sering ditemukan *Borrelia*.

Setiap bakteri mempunyai kepekaan yang berbeda-beda terhadap berbagai faktor lingkungan dan senyawa kimia. Kepekaan tersebut akan menghambat pertumbuhan bakteri karena bersifat toksik.

Alkohol 70% dan povidone iodine dapat digunakan sebagai desinfeksi kulit, senyawa fenol dapat digunakan sebagai desinfektan untuk alat. Daya hambat dan daya bunuh senyawa desinfektan tergantung pada konsentrasi dan waktu papar yang digunakan.

Kepekaan bakteri terhadap antibiotika dapat dilakukan dengan cara difusi agar (*disc method*) ataupun pengenceran antibiotika pada tabung (cara dilusi)

Self-assesment:

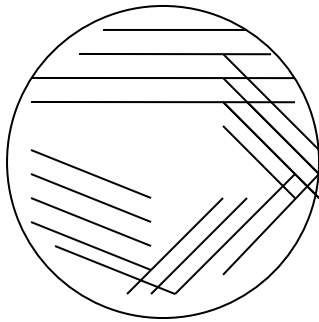
1. Jelaskan cara mengasingkan dan mengisolasi bakteri.
2. Jelaskan morfologi koloni bakteri.
3. Jelaskan cara mengisolasi flora normal tubuh, udara, tanah.
4. Jelaskan bakteri yang hidup sebagai flora normal kulit, mulut, udara dan tanah.
5. Jelaskan cara melakukan desinfeksi kulit dan desinfeksi alat.
6. Jelaskan cara penentuan KHM dan KBM.

MENGASINGKAN DAN MEMPELAJARI KOLONI BAKTERI

A. Cara mengasingkan bakteri:

Untuk mendapatkan koloni terpisah dari suatu bahan pemeriksaan, dilakukan penanaman pada lempeng agar dengan menggores secara penipisan menggunakan sengkeli (lihat gambar)

Mengasingkan bakteri secara penipisan:



Bahan: 1. Biakan cair dari campuran 2 jenis bakteri berpigmen

(*Staphylococcus albus* + *Chromobacterium violaceum*)

2. Lempeng agar nutrien

Tugas: Mengasingkan campuran bakteri di atas pada lempeng agar dengan menggoreskan dengan sengkeli dengan cara penipisan.

Inkubasi pada 37°C, 24 jam.

Gambar hasil dan sebutkan sifat koloninya.

B. Mempelajari koloni bakteri

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam mempelajari koloni bakteri adalah:

1. Ada/tidaknya pigmen
2. Besar koloni (diameter)
3. Permukaan koloni (menonjol atau rata)
4. Bentuk koloni: halus (smooth), kasar (rough), berlendir (mukoid)
5. Pinggiran rata atau tidak
6. Koloni menjalar atau bersulaman

Untuk koloni bakteri pada agar darah, perlu diperhatikan: ada/tidaknya zona hemolisa sekeliling koloni.

Tipe zona hemolisis:

1. Zona jernih / transparan, disebut hemolisa tipe beta (hemolisa sempurna)
2. Zona kehijauan, disebut hemolisa tipe alfa (hemodigesti)
3. Tidak ada zona, disebut hemolisa tipe gama (non hemolisa)

Tugas:

Melihat dan menggambar berbagai macam koloni bakteri.

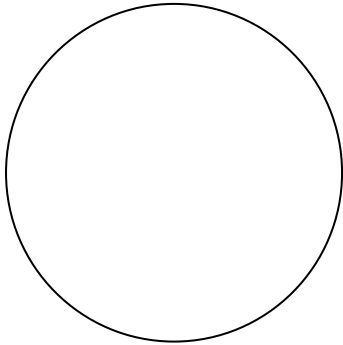
Pertunjukan:

1. Koloni S (smooth): *Escherichia coli*
2. Koloni R (rough): *Bacillus subtilis*
3. Koloni M (mukoid): *Klebsiella ozaenae*
4. Koloni menjalar: *Proteus sp.*
5. Koloni berpigmen: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*,
Staphylococcus citreus, *Serratia marcescens*,
Chromobacterium violaceum, *Pseudomonas aeruginosa*
6. Koloni Streptococcus pada agar darah: *hemolisa tipe alfa, beta dan gama.*

MORFOLOGI KOLONI

1. Koloni "*smooth*" (S)

Contoh:

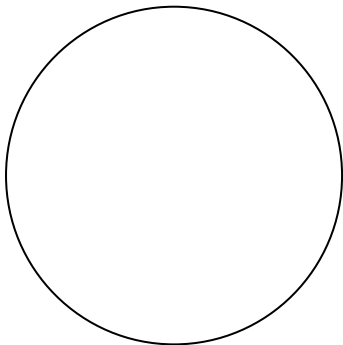


Perhatikan:

Permukaan koloni halus, pinggiran rata.
Biasanya koloni seperti terdapat pada bakteri patogen

2. Koloni berlendir/mukoid (M)

Contoh:

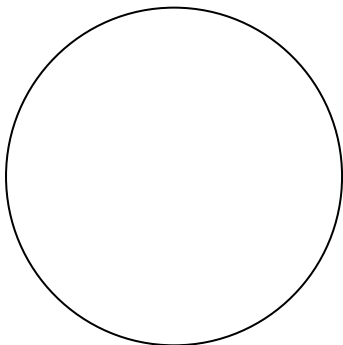


Perhatikan:

Koloni terlihat basah dan berlendir.
Koloni seperti ini terdapat pada bakteri yang mempunyai selubung atau simpai.

3. Koloni "*rough*" (R)

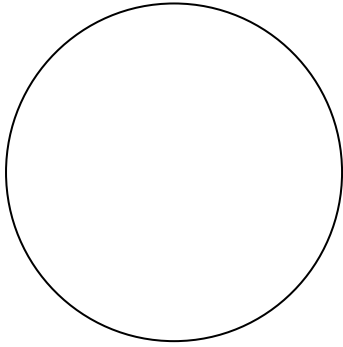
Contoh:



Perhatikan:

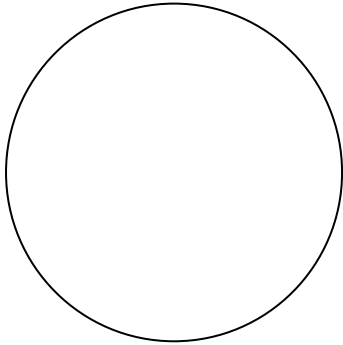
Permukaan koloni tampak kasar dan pinggiran tidak rata.
Koloni seperti ini biasanya terdapat pada bakteri berspora.

4. Koloni menjalar
Contoh:



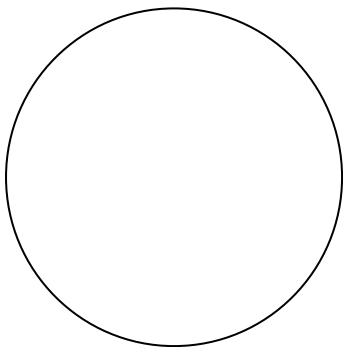
Suspensi bakteri ditetaskan ditengah-tengah lempeng agar.
Perhatikan:
Pertumbuhan menjalar sehingga menutupi permukaan lempeng agar.

5. Koloni bersulaman/beranyaman
Contoh:



Perhatikan:
Koloni terlihat membentuk sulaman

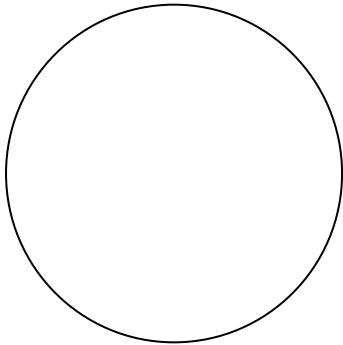
6. Cara penipisan kuman:
Contoh:



Perhatikan:
Ada berapa jenis koloni bakteri pada biakan ini!

7. Hemolisis tipe alfa/hemodigesti

Contoh:

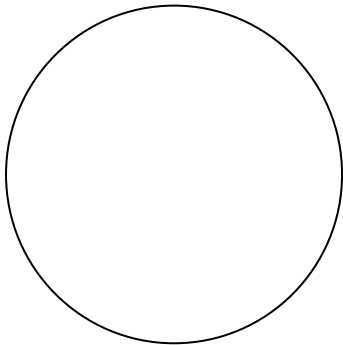


Perhatikan:

Zona kehijauan sekeliling koloni bakteri.

8. Hemolisis tipe beta / hemolisa sempurna

Contoh:

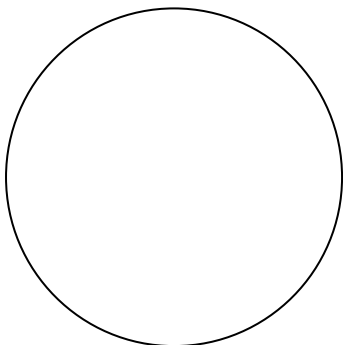


Perhatikan:

Zona jernih/transparan sekeliling koloni.

9. Hemolisis tipe gamma / anhemolisa

Contoh:



Perhatikan:

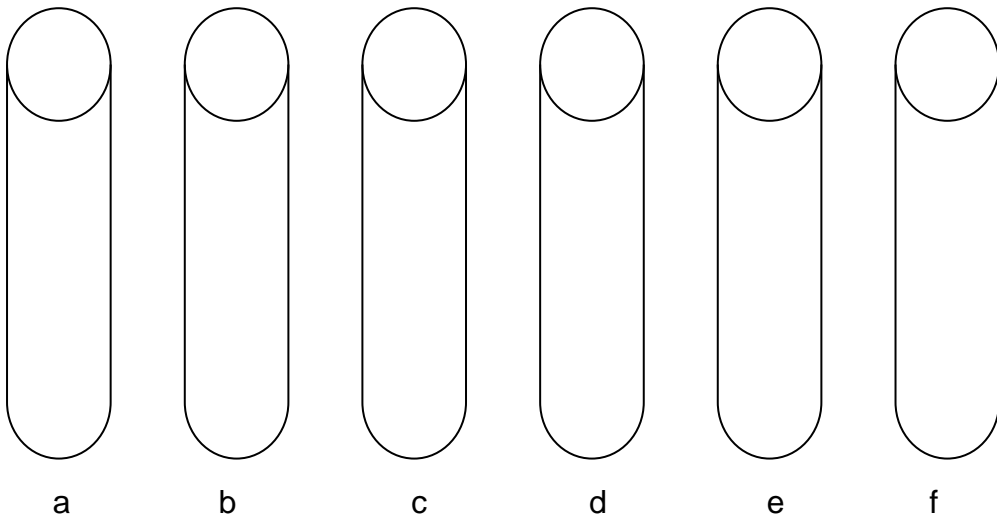
Tidak ada zona hemolisa sekeliling koloni.

10. Koloni bakteri berpigmen:

- | | |
|--------------------------------------|--------------------|
| a. <i>Staphylococcus epidermidis</i> | pigmen putih |
| b. <i>Staphylococcus aureus</i> | pigmen kuning emas |
| c. <i>Staphylococcus citreus</i> | pigmen kuning |
| d. <i>Serratia marcescens</i> | pigmen merah |
| e. <i>Chromobacterium violaceum</i> | pigmen ungu |
| f. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Pigmen hijau |

Perhatikan:

Pigmen *Pseudomonas aeruginosa* larut dalam air/medium, sehingga medium berwarna hijau.



FLORA NORMAL MULUT, KULIT DAN UDARA

Beberapa jenis kuman terdapat sebagai flora normal di tubuh, udara dan juga di tanah.

Bahan:

1. Tusuk gigi steril
2. Lempeng agar darah
3. NaCl faal steril
4. Ungu kristal karbol

Cara kerja:

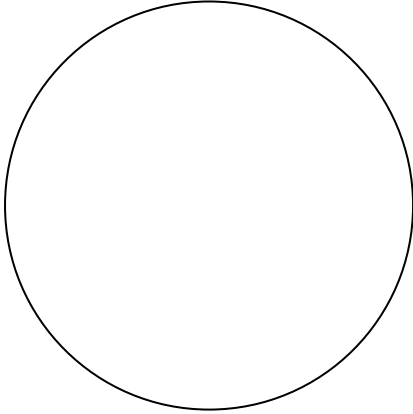
- a. Flora normal mulut
 1. Buat preparat kotoran gigi, rekatkan
 2. Warnai dengan ungu kristal karbol 1-2 menit
 3. Cuci dengan air, keringkan dengan kertas saring
 4. Lihat di bawah mikroskop (perbesaran okuler 10x, objektif 100x)
- b. Flora normal kulit
 1. Letakkan jari tangan pada lempeng agar darah
 2. Inkubasi lempeng agar darah pada 37°C 24 jam.
 3. Laporkan hasil!
- c. Flora normal udara
 1. Buka tutup lempeng agar darah, biarkan selama 15 menit
 2. Tutup kembali lempeng tersebut
 3. Inkubasi pada 37°C 24 jam
 4. Laporkan hasil!

Tugas:

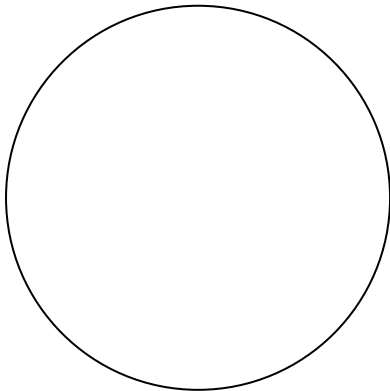
1. Setiap mahasiswa membuat preparat kotoran gigi dan mewarnainya.
2. Setiap grup melakukan melakukan flora normal kulit.
3. Setiap grup melakukan flora normal udara.

FLORA NORMAL MULUT, KULIT DAN UDARA

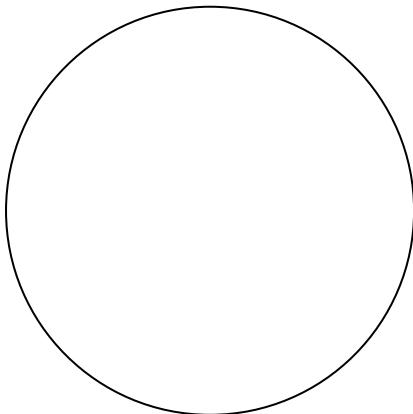
1. **Gambar preparat kotoran gigi**
(Mikroskopik)



2. **Gambar flora normal kulit**



3. **Gambar flora normal udara**



KEPEKAAN BAKTERI TERHADAP ANTIBIOTIKA

Penentuan kepekaan bakteri terhadap suatu antibiotika digunakan untuk pengobatan terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri tersebut.

Cara menentukan kepekaan bakteri:

1. Cara cakram (*disk method*) :

Cakram kertas saring yang telah mengandung antibiotik dengan dosis tertentu, diletakkan pada permukaan lempeng agar yang telah disebarkan bakteri sebelumnya, inkubasi 37°C, 18-24 jam.

Penilaian:

Mengukur diameter zona hambatan dan interpretasi sesuai dengan CLSI (Clinical Laboratory Standard International).

2. Cara tabung (*tube method*) :

Dibuat serial penipisan antibiotik dalam perbenihan cair.

Teteskan suspensi bakteri yang akan diperiksa.

Penilaian:

KHM = Konsentrasi Hambatan Minimal (MIC = *Minimal Inhibition Concentration*) adalah konsentrasi antibiotik terendah dimana tidak tampak pertumbuhan bakteri

KBM = Konsentrasi Bakterisidal Minimal (MBC = *Minimal Bactericidal Concentration*)

Cara kerja pengaruh antibiotik (cara cakram):

Bahan:

1. Biakan bakteri:
 - *E.coli*
 - *Staphylococcus aureus*
2. Lempeng agar nutrien
3. Usap kapas steril
4. Kaldu 1 ml
5. Cakram antibiotik

Tugas:

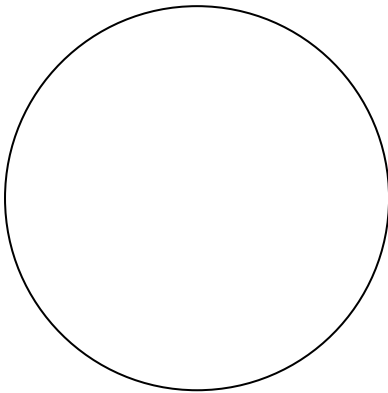
1. Buat suspensi bakteri dengan cara mengambil sedikit biakan bakteri 24 jam dan mencampurkan dalam NaCl 0,9% sampai homogen. Kemudian ukur kekeruhan dengan standard McFarland 0,5
2. Basahi usap kapas dalam suspensi bakteri tadi dan oleskan pada permukaan lempeng agar secara merata.
3. Tempelkan beberapa cakram antibiotika yang berbeda pada permukaan agar
4. Inkubasi pada 37° C, 18-24 jam.

Pertunjukan:

1. Kepekaan bakteri terhadap antibiotika dengan cara tabung.
2. Kepekaan bakteri terhadap antibiotika dengan cara cakram

Pengaruh antibiotika:

1. Cara cakram

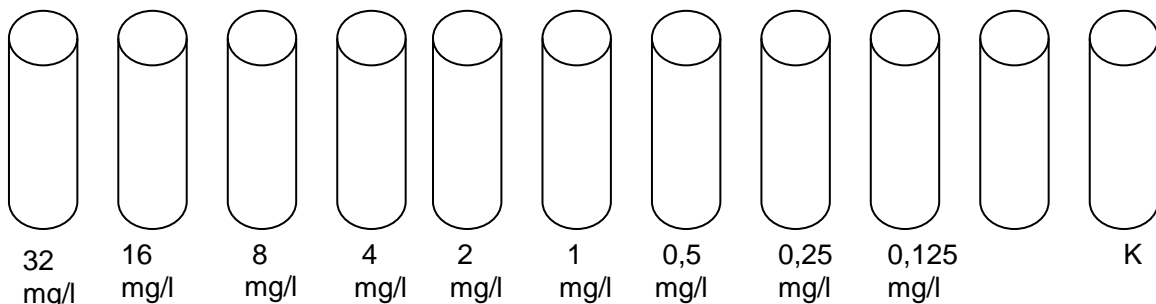


Perhatikan:

Kepekaan kuman.....terhadap antibiotik:

- 1.....hasil Sensitif/Intermediate/Resisten
- 2.....hasil Sensitif/Intermediate/Resisten
3. hasil Sensitif/Intermediate/Resisten

2. Cara tabung



—————→
Penipisan antibiotik

DAYA TAHAN BAKTERI TERHADAP DESINFEKTAN

Kepekaan bakteri terhadap suatu zat kimia, dapat dipakai untuk mencegah kontaminasi suatu bahan pemeriksaan. Misalnya: desinfeksi alat-alat, desinfeksi kulit tempat pengambilan darah penderita, mencuci tangan dan sebagainya.

A. DESINFEKSI KULIT

Cara kerja:

1. Bagian luar pelat agar darah dibagi atas 4 sektor dengan pinsil gelas.
2. Usap kapas steril yang telah dibasahi dengan NaCl 0,9% steril, diusapkan pada telapak tangan, kemudian ditanamkan pada sektor pertama pelat agar darah
3. Cuci tangan dengan seksama (1 menit) menggunakan sabun dan air.
Dengan usap kapas steril, usap tangan yang telah dicuci, kemudian tanam pada sektor ke-2 pelat agar darah.
4. Usap kapas steril basahi lagi dengan kaldu, diusap pada kulit lengan bagian bawah lalu tanam pada sektor ke-3 pelat agar darah.
5. Bersihkan lengan bagian bawah dengan tinctura iodii 3,5%, keringkan, bersihkan lagi dengan alkohol 70%, dengan usap kapas lain ulangi usap kulit lengan bawah bagian volar tadi, lalu tanam pada sektor ke-4 pelat agar darah.
6. Inkubasi pelat agar darah pada 37° C, selama 24 jam.
7. Laporkan dan catat hasilnya.

Bahan :

1. Tabung yang berisi NaCl 0,9% steril
2. Usap kapas steril
3. Pelat agar darah
4. Desinfektan : a. sabun
b. tinctura iodii 3,5%
c. alkohol 70%

Tugas : Melakukan desinfeksi kulit

Tabel 1. Pengaruh desinfektan pada pertumbuhan kuman

Sektor 1	Sektor 2	Sektor 3	Sektor 4

B. DESINFEKSI ALAT

Cara kerja:

- Empat batang gelas steril dimasukkan ke dalam suspensi bakteri (campuran *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*)
- Tiga dari empat batang gelas tadi dicelupkan ke dalam desinfektan Alkohol 70% atau lisol 5% dengan waktu yang berbeda 5 menit, 10 menit, 15 menit.
Kemudian tiap batang gelas dimasukkan ke dalam kaldu steril.
Satu batang gelas dari suspensi bakteri langsung ke dalam kaldu tanpa perlakuan desinfektan (sebagai kontrol).
- Inkubasi pada 37° C selama 24 jam. Baca hasil dan laporkan.

Bahan :

- Empat batang gelas steril (2x)
- Biakan bakteri 24 jam (campuran *S. aureus* + *E. coli*)
- Alkohol 70% (3 tabung)
- Lisol 5% (3 tabung)
- Kaldu steril 4 tabung @ 4 ml (2x)

Tugas :

- Melakukan desinfeksi alat dengan alkohol 70%
- Melakukan desinfeksi alat dengan lisol 5%.

Tabel 2. Pengaruh desinfektan pada pertumbuhan kuman

Jenis Desinfektan	5 menit	10 menit	15 menit	Kontrol negatif	Kontrol positif

Mikrobiologi Kedokteran

Blok 12	: Infeksi dan Imunitas
Praktikum	: 3
Topik	: <ul style="list-style-type: none">➤ Gerak bakteri➤ Reaksi Biokimia➤ Pemeriksaan Immunologi dan Penyakit Infeksi
Pengampu	: Herman Sunaryo, dr. MS, Elisabeth Harahap, Dra, MS, Donna Mesina R.Pasaribu, S.Si., M.Biomed Wani Devita Gunardi, Dr., dr., Sp.MK (K) Ade Dharmawan, dr, Sp.MK Nicolas Layanto, dr, Sp.MK
Waktu	: 100 menit

Sasaran Belajar :

1. Memahami bakteri gerak positif dan gerak negatif
2. Memahami cara melakukan identifikasi bakteri dengan reaksi uji biokimia
3. Memahami pemeriksaan serologi untuk penyakit infeksi seperti infeksi virus dengue

Buku Wajib:

1. Jawetz, Melnick & Adelberg's. 2016. Medical Microbiology. 27thed. Mc Graw Hill Lange. New York.
2. Patrick Murray, *et al* . 2016. Medical Microbiology. 8th ed. Port Mosby, USA.
3. Goering RV, *et al*. Mims' Medical Microbiology. 5th ed. 2013. Elseviers

Referensi:

1. Mahon, *et al*. 2014. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Wb. Saunders Company Philadelphia.
2. Bailey & Scott's, *et al*. 2016. Diagnostic Microbiology. 14th ed. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri.

Ringkasan:

Bakteri bergerak karena mempunyai flagel dan tidak bergerak karena tidak ada flagel. Metabolisme setiap bakteri berbeda, hal ini disebabkan adanya perbedaan enzim yang dimilikinya, dan ini menentukan perbedaan sifat biokimia, yang dapat dipakai untuk menentukan identifikasi dan klasifikasi bakteri.

Reaksi serologi adalah reaksi antigen-antibodi invitro. Pemeriksaan serologi dilakukan untuk mendeteksi adanya antigen mikroba atau adanya antibodi spesifik terhadap antigen mikroba. Diagnosis dapat ditegakkan dengan melihat keberadaan antibodi IgM terhadap suatu mikroorganisme patogen yang menandakan infeksi yang baru atau sedang berlangsung atau dengan melihat kenaikan titer antibodi sebesar Empat kali atau lebih antara serum masa akut dan serum masa konvalesen, ini menunjukkan adanya infeksi.

Self-assesment:

1. Jelaskan bakteri dengan gerak positif dan gerak negatif.
2. Jelaskan cara melakukan identifikasi bakteri dengan reaksi uji biokimia.
3. Jelaskan cara melakukan pemeriksaan serologi untuk penyakit infeksi seperti infeksi virus dengue.

GERAK BAKTERI

Bakteri bergerak atau tidak diperlukan untuk menentukan jenis bakteri. Bakteri berflagel dan golongan *Spirochaetacea* merupakan bakteri yang dapat bergerak.

Cara melihat gerak bakteri:

1. Secara langsung

Biakan bakteri umur 18-24 jam, dibuat preparat, langsung dilihat dengan mikroskop biasa atau mikroskop lapang gelap.

Ada 2 cara:

- a. Cara tetes tegak
- b. Cara tetes gantung

2. Secara tidak langsung

Dengan membiakkan pada agar tegak semisolid.

Inkubasi 18-24 jam.

Bahan:

1. Biakan bakteri:
 - a. *E. coli*, *Vibrio sp*
 - b. *Staphylococcus sp.*
2. Gelas objek rata, gelas objek cekung, kaca penutup dan vaselin.
3. Agar semisolid (0,5% agar)

Tugas:

Melakukan penanaman gerak bakteri pada semisolid.

Melihat hasil penanaman setelah inkubasi 24 jam.

Menggambar hasil pengamatan.

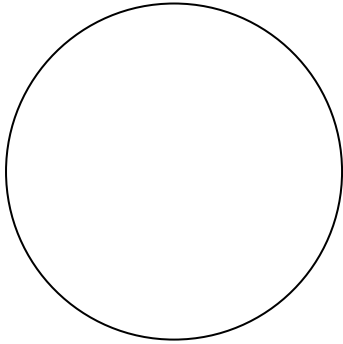
Pertunjukan:

1. Cara membuat sediaan tetes tegak dan tetes gantung.
(Melihat gerak positif dan gerak negatif/gerak Brown).
2. Cara menanam gerak pada agar semisolid dengan menggunakan sengkeli jarum.

GERAK BAKTERI

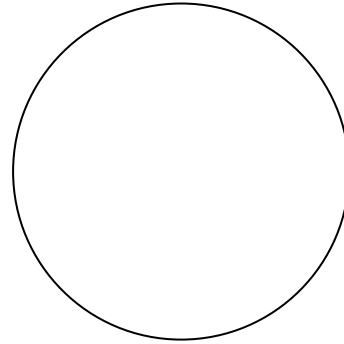
Mikroskopik:

Gerak positif / gerak aktif



Perhatikan:
Bakteri bergerak dan berpindah tempat

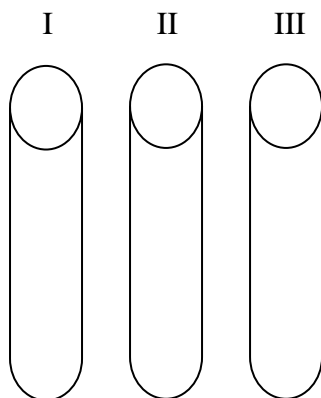
Gerak negatif / gerak pasif
(gerak *Brown*)



Perhatikan:
Bakteri tidak bergerak atau
bergetar ditempat.

Makroskopik:

Gerak bakteri pada agar semisolid



Keterangan:

- I. Agar semisolid (0,5% agar)
- II. Gerak negatif
- III. Gerak positif

REAKSI BIOKIMIA UNTUK IDENTIFIKASI BAKTERI

Metabolisme bakteri yang satu dapat berbeda dengan yang lain, ini disebabkan adanya perbedaan pada enzim yang dimilikinya, dan ini menentukan perbedaan sifat-sifat biokimianya. Perbedaan sifat biokimia ini dapat dipakai untuk identifikasi dan klasifikasi bakteri. Sifat-sifat biokimia antara lain:

1. Peragian gula

Ada bakteri yang dapat meragi gula dengan atau tanpa pembentukan gas, ada juga yang tidak dapat meragi gula sama sekali. Pada peragian dibentuk asam, yang dapat dibuktikan dengan indikator misalnya Ungu brom kresol.

Hasil : Ada peragian, warna ungu menjadi kuning.

2. Tes indol

Ada bakteri yang dapat membentuk indol dari triptofan, yang dapat dilihat dengan reagensia Ehrlich.

Cara kerja:

Bakteri ditanam pada perbenihan air pepton. Setelah tumbuh masukkan reagen Ehrlich (paradimetil aminobenzaldehid).

Hasil : Indol positif berwarna merah.

3. Tes Voges-Proskauer (VP)

Pembentukan asetil metal karbinol, dapat dibuktikan dengan reaksi VP.

Cara kerja:

Ke dalam 5 ml biakan di dalam pepton glukosa fosfat umur 2 hari, dimasukkan 3 ml larutan 5- α naftol dalam alcohol absolute, lalu ditambahkan 1 ml KOH 40%.

Kocok dengan baik dan baca hasil setelah 5-15 menit.

Hasil : VP positif berwarna merah

4. Tes Merah-Metil

Terjadi penurunan pH di bawah 5, sehingga penambahan beberapa tetes indikator Merah metil menyebabkan cairan berwarna merah. Perbenihan yang dipakai adalah kaldu glukosa fosfat, biakan umur 3-4 hari.

Hasil: Merah metil positif berwarna merah.

5. Tes Sitrat

Melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dalam metabolisemenya. Perbenihan sitrat dengan indikator biru brom timol.

Hasil: Sitrat positif berwarna biru.

6. Tes Ureasa

Melihat kemampuan kuman memecah urea dan membentuk ammonia, dengan dihasilkannya enzim ureasa. Indikator: merah fenol.

Hasil: Ureasa positif berwarna merah

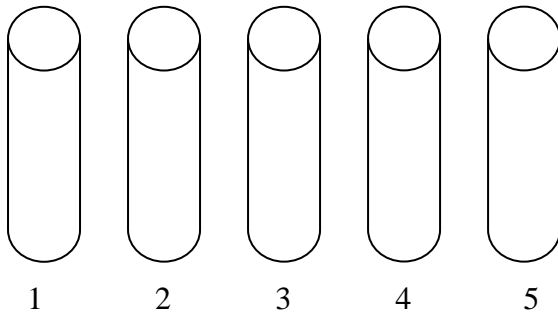
7. Tes TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) – Tes KIA (*Kliger's Iron Agar*)

REAKSI YANG TERLIHAT PADA TSIA			
PENGAMATAN	REAKSI		KESIMPULAN
Bagian lereng (slant) Basa/merah, Bagian tusukan (butt) asam/kuning	Basa/asam	-/+	Peragi glukosa, <u>tidak meragi laktosa.</u>
Bagian lereng dan tusukan asam/kuning dan ada gas	Asam/asam, gas	+/+gas	Peragi glukosa + laktosa dan /atau sakharosa*, membentuk gas.
Bagian lereng basa/merah, Bagian tusukan asam/kuning dan hitam	Basa/asam, H ₂ S	-/+ H ₂ S	Tidak meragi laktosa dan membentuk H ₂ S
Bagian lereng dan tusukan Basa/merah	Basa/basa	-/-	Tidak meragi gula
*Pada reaksi KIA : asam/asam menunjukkan peragi glukosa dan laktosa. KIA tidak mengandung sakharosa TSIA : mengandung glukosa, laktosa dan sakharosa.			

Pertunjukan:

1. Deretan gula-gula yang belum ditanam (glukosa, laktosa, manitol, maltosa, sakharosa)
2. Gula glukosa dengan peragian negatif
3. Gula glukosa dengan peragian positif tanpa pembentukan gas
4. Gula glukosa dengan peragian positif dan pembentukan gas
5. Tes indol positif-negatif
6. Tes VP positif-negatif
7. Tes merah metil positif-negatif
8. Tes sitrat positif-negatif
9. Tes ureasa positif-negatif
10. TSIA : -/-, -/+, -/+ H₂S, +/+ gas.

Cairan pepton gula

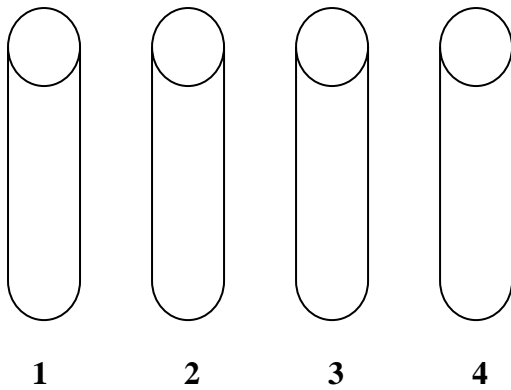


Keterangan:

1. Glukosa (tutup kuning)
2. Laktosa (tutup ungu)
3. Manitol (tutup hijau)
4. Maltosa (tutup merah)
5. Sakharosa (tutup biru)

Indikator : Ungu brom kresol

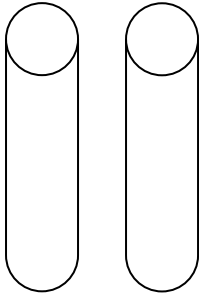
Pertumbuhan dan peragian pada glukosa



Keterangan:

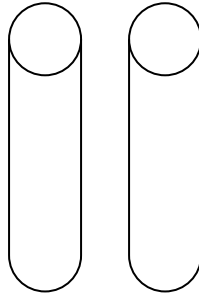
1. Glukosa 1% steril (belum ditanam)
2. Bakteri tumbuh tanpa meragi glukosa
3. Bakteri tumbuh meragi glukosa menjadi asam tanpa gas
4. Bakteri tumbuh meragi glukosa menjadi asam dan membentuk gas

Tes Indol



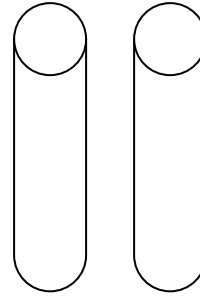
(-) (+)

Tes VP



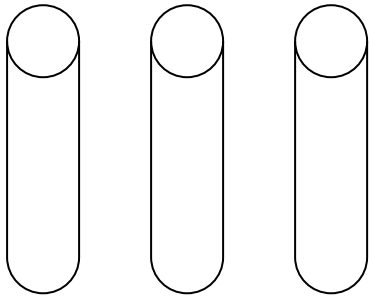
(-) (+)

Tes Merah metil



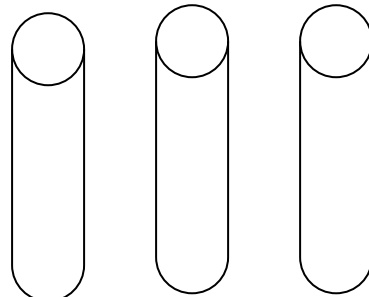
(-) (+)

Tes Ureasa



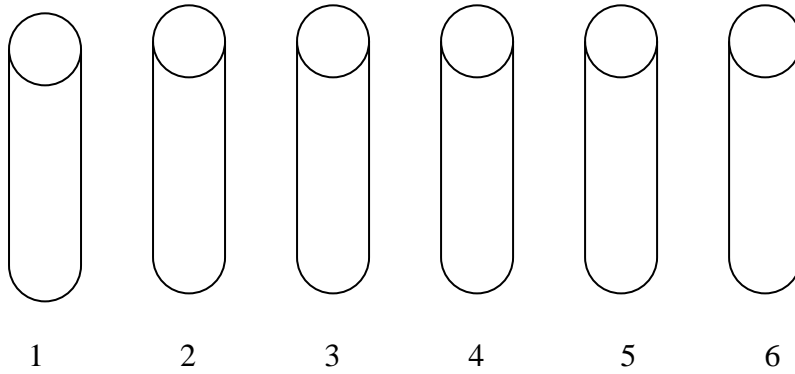
K (-) (+)

Tes Sitrat



K (-) (+)

Tes TSIA



Keterangan:

1. TSIA steril
2. Tidak meragi glukosa, laktosa, sakharosa
3. Peragi glukosa, tidak meragi laktosa
4. Peragi glukosa, tidak meragi laktosa, H₂S sedikit
5. Peragi glukosa, tidak meragi laktosa, H₂S banyak
6. Peragi glukosa, laktosa, sakharosa dan membentuk gas.

PEMERIKSAAN IMUNOLOGI PENYAKIT INFEKSI

Pemeriksaan imunologik untuk diagnosis penyakit infeksi dapat dilakukan dengan reaksi antigen-antibodi invitro, disebut reaksi serologi.

Reaksi serologi pada dasarnya dapat dibagi atas:

- 1 Uji untuk deteksi antigen mikroba
- 2 Uji untuk deteksi antibodi spesifik terhadap antigen mikroba.

Uji untuk deteksi atau identifikasi antigen dapat dilakukan dengan cara langsung dari spesimen klinik atau identifikasi kuman setelah pembiakan. Uji untuk deteksi antibodi dapat dirancang untuk mendeteksi respon antibodi tertentu, misalnya untuk mendeteksi antibodi yang berupa imunoglobulin G (IgG) atau IgM. Antibodi IgM muncul lebih dini pada suatu infeksi dibanding IgG.

Diagnosis dapat ditegakkan dengan melihat keberadaan antibodi IgM terhadap suatu mikroorganisme patogen menandakan infeksi yang baru atau sedang berlangsung atau dengan melihat kenaikan titer antibodi sebesar 4 kali atau lebih antara serum masa akut dan serum masa konvalesen, ini menunjukkan adanya infeksi.

Dalam praktikum ini akan diperlihatkan beberapa reaksi serologi untuk diagnosa penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dengue:

1. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) untuk mendeteksi antigen NS1 dari virus dengue
2. IgM dan IgG dengue (*Rapid Immunochromatographic test*)
3. Hemaglutinasi (HA)
4. Hambatan Hemaglutinasi (HI)

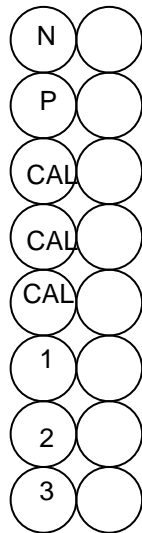
1. ELISA untuk deteksi antigen NS1 dari serum/plasma penderita.

Prinsip:

Antibodi NS1 yang ditempelkan pada plate akan berikatan dengan antigen NS1 dari serum penderita, dideteksi dengan monoklonal antibodi anti-NS1 yang dilabel dengan enzim kemudian diberi substrat dan akan terbentuk warna. Warna diukur dengan spektrofotometer sehingga diperoleh nilai *optical density (OD)*.

Prosedur ELISA

Kit yang digunakan: *Panbio Dengue ELISA kit*
Pemeriksaan mengacu pada protokol dari kit.



- Pipet 100 ul sampel test dan kontrol ke tiap sumur
- Tutup plate, inkubasi 1 jam 37°C
- Cuci 6 kali
- Tambahkan 100 ul *HRP Conjugated Anti-NS1 Mab*
- Tutup plate, inkubasi 1 jam, 37°C
- Cuci 6 kali
- Tambahkan substrat TMB a' 100 ul
- Inkubasi 10 menit, RT
- Tambahkan larutan stop
- Baca dengan spektrofotometer

Perhitungan:

$$\text{Index Value} = \frac{\text{Sample Absorbance}}{\text{Cutt-off Value}}$$

Contoh: Sample A Absorbance = 0.949
Sample B Absorbance = 0.070

Rata-rata absorbance of Calibrator = 0.802
Calibration Factor = 0.62
Cutt-off Value = 0.802 x 0.62 = 0.497

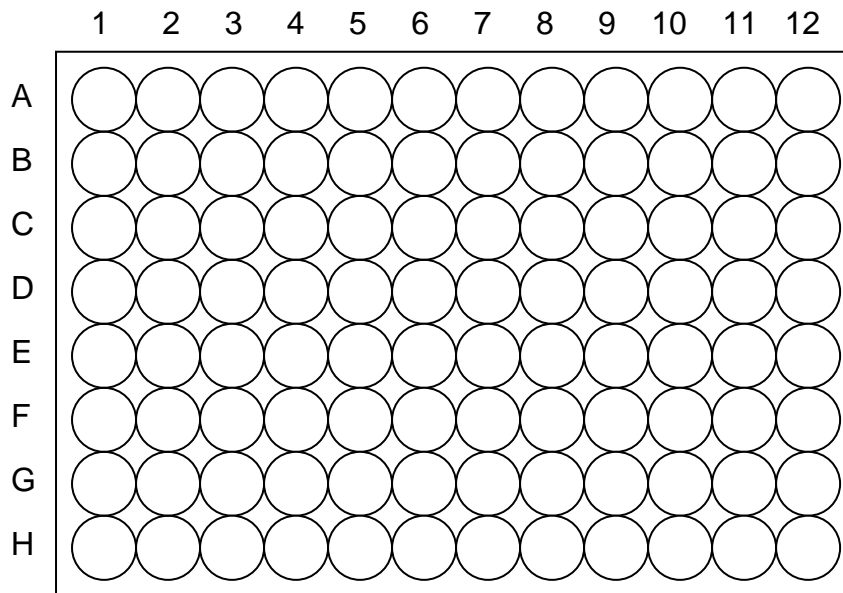
$$\text{Panbio Units} = \text{Index Value} \times 10$$

Sample A 1,91 X 10 = 19.1 Panbio Units
Sample B 0.14 X 10 = 1.4 Panbio Units

Interpretasi hasil :

INDEX	PANBIO UNITS	RESULTS
<0.9	<9	Negatives
0.9-1.1	9 – 11	Equivocal
>11	>11	Positive

Gambar reaksi ELISA NS1-Dengue :



2. Penentuan IgM dan IgG anti-dengue dengan metode imunokromatografi.

Antibodi IgM atau IgG terhadap virus dengue yang ada dalam serum akan ditangkap secara spesifik masing-masing oleh antibodi anti-human IgM atau IgG yang terikat pada membran nitroselulosa sebagai fase padat. Antibodi anti-human IgM dan IgG pada membran + antibodi IgM / IgG serum + antigen dengue + monoklonal antibodi anti-dengue yang dilabel gold → warna.

Cara kerja:

Pemeriksaan mengacu pada protokol dari kit.

Interpretasi:

Infeksi primer

Infeksi sekunder

Bukan infeksi

3. Reaksi Hemaglutinasi dan Hambatan hemaglutinasi

Beberapa jenis virus dapat menggumpalkan sel darah merah ayam atau binatang lain, disebut hemaglutinasi. Hemaglutinasi ini dapat dihambat oleh antibodi homolog yang terdapat di dalam serum kebal, disebut hambatan hemaglutinasi. Hambatan hemaglutinasi ini dapat dipakai untuk diagnosa beberapa penyakit virus.

Cara kerja:

Reaksi Hemaglutinasi (HA):

- Buat penipisan antigen/virus pada deretan sumur-sumur microplate
- Tambahkan sel darah merah
- Inkubasi 37° C, 1 jam
- Baca hasil

Titer antigen/virus adalah angka kebalikan penipisan tertinggi yang masih memberikan hemaglutinasi, disebut: 1 unit HA.

Untuk reaksi hambatan hemaglutinasi digunakan antigen/virus: 4 – 8 unit.

Reaksi Hambatan Hemaglutinasi (HI):

- Buat penipisan serum pasien pada deretan sumur-sumur microplate
- Tambahkan antigen 4-8 unit pada masing-masing sumur
- Inkubasi satu malam pada 4° C.
- Tambahkan sel darah merah
- Inkubasi 37° C, 1 jam.
- Baca hasil

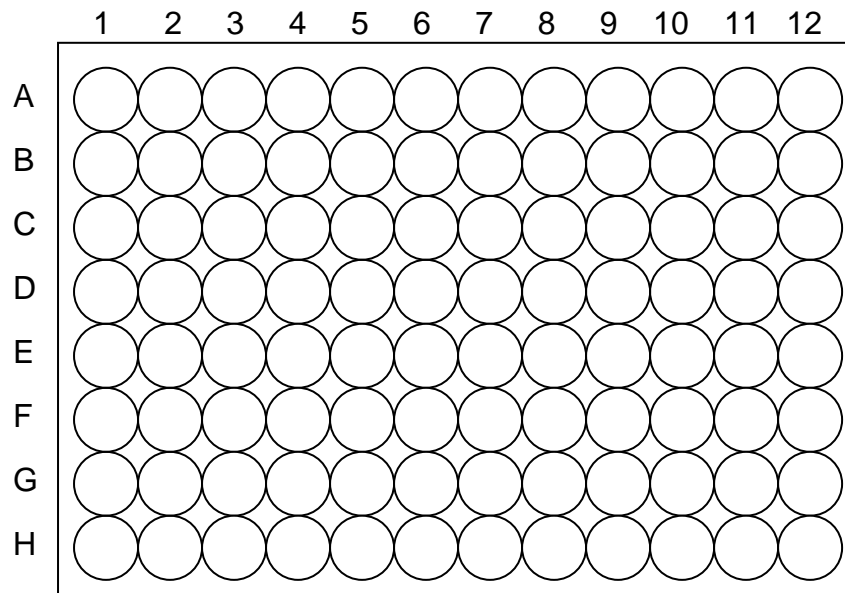
Titer antibodi adalah angka kebalikan penipisan tertinggi serum yang masih menghambat hemaglutinasi.

Perhatikan:

Titer antibodi antara serum masa akut dengan serum pada masa konvalesen.

Kenaikan titer sebanyak 4 kali atau lebih dari serum masa akut sampai serum masa konvalesen menunjukkan adanya infeksi.

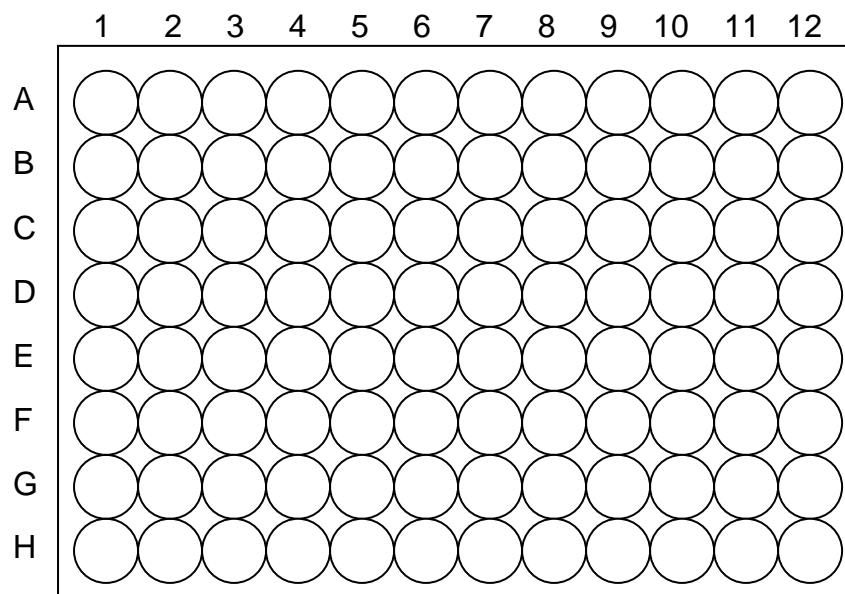
Gambar reaksi hemaglutinasi :



Titer antigen/virus :.....

Untuk reaksi hambatan hemaglutinasi penipisan antigen :.....

Gambar reaksi hambatan hemaglutinasi:



Titer serum masa akut :.....

Titer serum masa konvalesens :.....

Diagnosa : ada infeksi atau tidak ada infeksi.

Mikrobiologi Kedokteran

Blok 13	: Tumbuh Kembang
Praktikum	: 4
Topik	: Pemeriksaan serologi <ul style="list-style-type: none">➤ Treponema spp,➤ Cytomegalovirus,➤ Rubella virus, Herpes virus
Pengampu	: Herman Sunaryo, dr. MS, Elisabeth Harahap, Dra, MS, Donna Mesina R.Pasaribu, S.Si., M.Biomed Wani Devita Gunardi, Dr., dr., Sp.MK (K) Ade Dharmawan, dr, Sp.MK Nicolas Layanto, dr, Sp.MK
Waktu	: 100 menit

Sasaran Belajar :

1. Memahami pemeriksaan serologi berdasarkan reaksi antigen-antibodi secara invitro.
2. Memahami reaksi serologi spesifik dan non spesifik terhadap penyakit sifilis
1. Memahami pemeriksaan infeksi Cytomegalovirus dengan cara immunofluorescence

Buku Wajib:

1. Jawetz, Melnick & Adelberg's. 2016. Medical Microbiology. 27thed. Mc Graw Hill Lange. New York.
2. Patrick Murray, *et al* . 2016. Medical Microbiology. 8th ed. Port Mosby, USA.
3. Goering RV, et al. Mims' Medical Microbiology. 5th ed. 2013. Elseviers

Referensi:

1. Mahon, *et al*. 2014. Texbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Wb. Saunders Company Philadelphia.
2. Bailey & Scott's, *et al*. 2016. Diagnostic Microbiology. 14th ed. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri.

Ringkasan:

Reaksi serologi terhadap penyakit sifilis terdiri dari reaksi non spesifik (VDRL dan RPR) dan reaksi spesifik (TPHA dan TPI). Reaksi non spesifik VDRL dan RPR dilakukan berdasarkan reaksi flokulasi sedangkan TPHA berdasarkan reaksi hemaglutinasi pasif. Reaksi ini menggunakan sel darah merah yang dilapisi oleh antigen dari kuman *Treponema pallidum* dan bila ada antibody yang homolog akan terjadi reaksi hemaglutinasi. Kit untuk pemeriksaan TPHA telah tersedia secara komersial.

Self-assesment:

1. Jelaskan prinsip reaksi serologi spesifik dan non spesifik untuk penyakit infeksi sifilis.
2. Jelaskan cara pemeriksaan imunofluoresens untuk infeksi Cytomegalovirus.

PRAKTIKUM BLOK 13
(*GROWTH & DEVELOPMENT*)

Praktikum 4 :

Pemeriksaan serologi

- A. Treponema spp.
- B. Cytomegalovirus
- C. Rubella virus, Herpes virus

PEMERIKSAAN SEROLOGI

Treponema pallidum adalah bakteri penyebab sifilis. Bentuk spiral dengan 10-12 lekukan teratur, bergerak berputar menurut sumbu panjangnya. Pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan khusus (Becker-Krants, Fontana Tribondeau), atau dengan mikroskop lapang gelap.

Reaksi serologi terhadap penyakit sifilis:

- Non spesifik : **VDRL** (*Venereal Diseases Reference Laboratory*)

RPR (*Rapid Plasma Reagin*).

- Spesifik : **TPHA** (*Treponema Pallidum Haemagglutination*)

TPI (*Treponema Pallidum Immobilization*)

Reaksi VDRL dan RPR

Adalah reaksi flokulasi yang paling banyak dilakukan untuk diagnosa penyakit sifilis. Merupakan reaksi antigen-antibodi, dimana antigen yang digunakan adalah kardiolipin lesitin. Pada reaksi positif terlihat gumpalan (flokulasi). Pada reaksi RPR, antigen diikatkan pada charcoal sehingga hasil positif terlihat sebagai gumpalan berwarna hitam.

Cara kerja:

Mengacu pada protokol kit yang digunakan.

Kit terdiri dari: antigen, serum kontrol positif dan serum kontrol negatif, kartu yang mempunyai lingkaran-lingkaran untuk melakukan reaksi.

Serum pasien yang akan diperiksa dibuat pengenceran dengan NaCl faal pada lingkaran yang tersedia dimulai dengan pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, dst, kemudian teteskan antigen.

Lakukan juga terhadap serum kontrol positif dan kontrol negatif. Goyang dengan kecepatan 100 rpm selama 6 menit. Baca hasil, bandingkan dengan kontrol.

Reaksi TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination*)

Prinsip:

Dasar reaksi adalah hemaglutinasi pasif.

Sel darah merah dilapisi dengan antigen dari kuman *Treponema pallidum*.

Bila ada antibodi yang homolog akan menyebabkan hemaglutinasi.

Kit TPHA telah tersedia secara komersil.

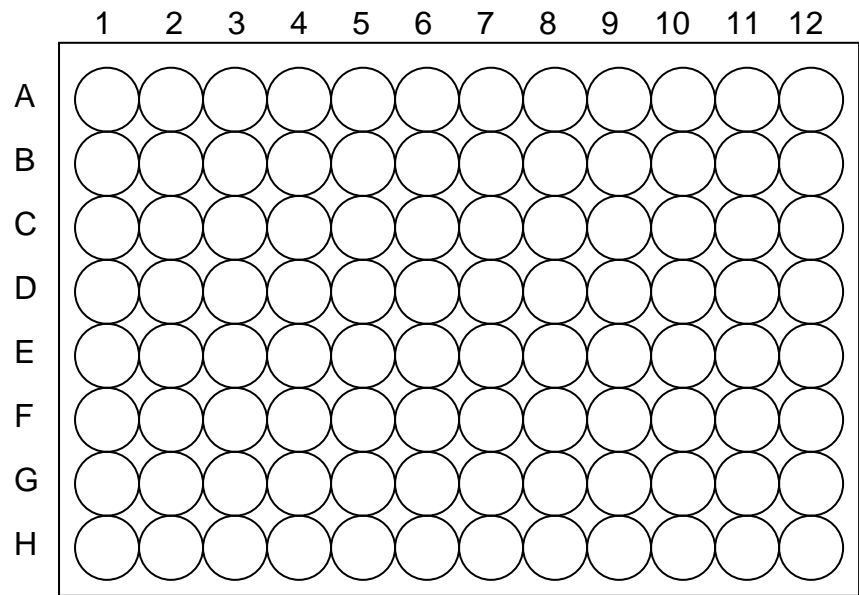
Cara kerja:

Mengacu pada protokol dari kit yang digunakan.

Kit terdiri dari:

1. Sel kontrol (sel darah merah yang tidak dilapisi antigen *T. pallidum*)
2. Sel test (sel darah merah yang dilapisi antigen *T. pallidum*)
3. Kontrol serum negatif
4. Kontrol serum positif
5. Diluen (pelarut)

Gambar reaksi TPHA:



Titer antibodi adalah.....

2. Cytomegalovirus (CMV)

Pemeriksaan infeksi CMV, dapat dilakukan dengan:

1. Immunofluorescence, untuk mendeteksi antigenemia
2. Biakan virus dan immunoperoksidase untuk mendeteksi viremia.

1. Deteksi antigenemia dengan teknik immunofluoresens

Prinsip:

Antigen CMV pp 65 dalam sel leukosit dapat berikatan dengan antibodi monoklonal pp 65 (antibodi pertama), kemudian kompleks antigen-antibodi ini dapat dideteksi dengan antibodi kedua yaitu anti terhadap antibodi pertama yang dilabel dengan FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*)

Cara kerja:

Mengacu pada protokol kit yang digunakan.

Kit terdiri dari:

- *CMV pp65 Monoclonal antibody*
- *Anti-mouse IgG:FITC Conjugate*
- *Separation solution*
- *Lyse stop*
- *Fixation solution*
- *Permeabilization solution*
- *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
- *Washing solution*

Pemisahan sel-sel leukosit:

- Pisahkan sel leukosit dari darah dengan menggunakan larutan pemisah
- Buat preparat sel leukosit pada gelas alas
- Fiksasi dengan larutan fiksasi
- Tambahkan antibodi monoklonal pp65
- Inkubasi 37° C, selama 30 menit suasana lembab
- Cuci dengan larutan pencuci
- Tambahkan *anti-mouse IgG:FITC conjugate*
- Inkubasi 37° C, selama 30 menit suasana lembab/gelap
- Cuci dengan larutan pencuci
- Tutup preparat
- Lihat menggunakan mikroskop fluoresens dengan perbesaran 400 x.

Hasil **positif** : terlihat sel dengan inti yang berfluoresensi hijau

Hasil **negatif** : tidak terlihat sel-sel dengan inti berfluoresensi.

Gambar sel-sel yang terinfeksi CMV

(Immunofluoresens)

