



www.esaunggul.ac.id

**METODE DIAGNOSTIK MIKROBIOLOGI
PERTEMUAN 10-11
INHERNI MARTI ABNA, S.SI, M.SI
PRODI KESEHATAN MASYARAKAT
FAKULTAS ILMU KESEHATAN**

Metode Diagnostik Mikrobiologi

Oleh: Inherni Marti Abna

Bakteri Flora Normal

Pada Organ Tubuh Manusia

Flora normal (mayoritas bakteri) pada kulit dan saluran pencernaan mencegah kolonisasi bakteri patogenik dengan mengeluarkan substansi toksik atau dengan bersaing mendapatkan nutrisi. Ada 10^{13} sel dan terdapat 10^{14} bakteri, yang mayoritas hidup di usus besar.

- Ada 10^3 - 10^4 **mikroba** per cm^2 di **kulit** (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Diphtheroid, Streptococci, Candida dll.).
- Berbagai macam **bakteri** hidup di **hidung dan mulut**
- Di **lambung dan usus halus** terdapat **Lactobacilli**
- Di **usus halus** terdapat 10^4 **bakteri** per gram dan di **usus besar** 10^{11} per gram, 95-99% di antaranya adalah anaerob.
- Di **saluran kemih** terdapat koloni berbagai **bakteri dan difteroid**.
- Setelah **pubertas**, terdapat **koloni Lactobacillus aerophilus** yang memfermentasi glikogen untuk mempertahankan pH asam.

Flora normal menciptakan kesesuaian ekologis dalam tubuh, dan menghasilkan bakteriosidin, defensin, protein kationik dan laktoferin yang merusak bakteri lain.

Prosedur Laboratorium Untuk Diagnosis Penyakit Infeksi

1. Mikroskopis langsung
melalui pengecatan/pewarnaan spesimen dan mengidentifikasi mikroorganisme secara morfologis
2. Biakan/kultur
3. Tes Serologi
4. Diagnosis molekuler , Hibridisasi DNA-DNA atau DNA-RNA untuk deteksi adanya gen-gen spesifik patogen dari spesimen pasien

Komunikasi dokter -laboratorium

- Penyebab infeksi sangat beragam tergantung pada gejala klinis dan jenis m.o penyebabnya; bakteri, virus, jamur, parasit
- Tidak ada satupun uji yang memungkinkan untuk isolasi atau karakterisasi semua m.o patogen
- Sangat dibutuhkan informasi klinis atau diagnostik sementara

Mendapatkan Hasil Laboratorium Yang Baik

Untuk mendapatkan Diagnosa laboratorium yang baik dari suatu spesimen tergantung kepada beberapa hal yang penting;

1. CARA PENGAMBILAN SPESIMEN
2. CARA PENGIRIMAN SPESIMEN
3. CARA PENYIMPANAN SPESIMEN
4. TEKNIK/CARA KERJA DI LABORATORIUM

Spesimen

Spesimen tidak lagi representatif bila mikroorganisme bermultiplikasi selama pengumpulan, pengiriman atau penyimpanan

PENGAMBILAN SPECIMEN

1. CARA

Steril : lokasi pengambilan, alat untuk mengambil, wadah

2. WAKTU

- sebelum terapi antibiotic
- pd stad peny ttt dimana mikroba penyebab bisa ditemukan.
- tifoid : isolasi *Salmonella* dari darah → mg pertama penyakit
- Sewaktu, pagi hari, atau dikumpulkan 24 jam

3. LOKASI

- kemungkinan ditemukan penyebab : paling jelek
- paling dalam

4. JUMLAH : sesuai kebutuhan.

Sputum merupakan bahan yang digunakan sebagai salah satu sampel pemeriksaan laboratorium untuk mendiagnosa berbagai macam penyakit tertentu.

Pemeriksaan sputum merupakan salah satu pemeriksaan utama khususnya untuk penyakit di paru-paru dan sekitarnya yang dapat dideteksi dengan sputum.

- Sampel dahak terbaik adalah yang mengandung sangat sedikit saliva atau air liur, karena air liur dapat mengontaminasi sampel dengan bakteri oral.
- Sampel kemudian diteliti oleh mikrobiologi klinis dengan pewarnaan gram pada dahak. Lebih dari 25 sel epitelia skuamosa menunjukkan kontaminasi saliva.

Klasifikasi sputum

- Sputum yang dihasilkan sewaktu membersihkan tenggorokan, kemungkinan berasal dari sinus, atau rongga hidung, bukan berasal dari saluran napas bagian bawah.
- Sputum banyak dan purulen kemungkinan proses supuratif (eg. **Abses paru**)
- Sputum yang terbentuk perlahan dan terus meningkat kemungkinan tanda **bronkhitis/ bronkiektasis**.

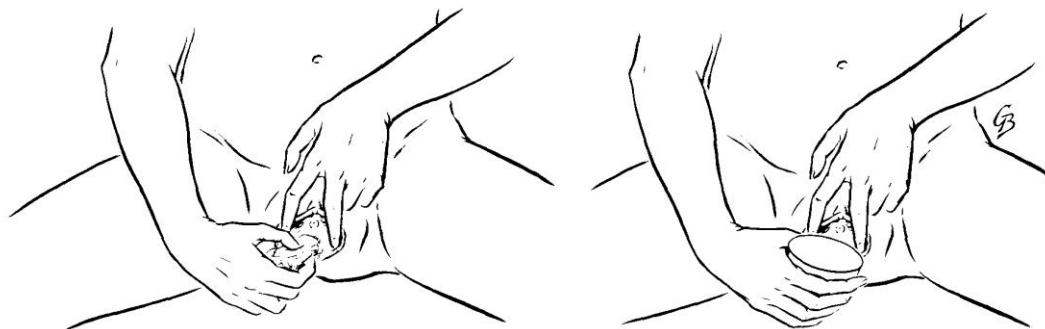
- Sputum kekuning-kuningan kemungkinan proses infeksi.
- Sputum hijau kemungkinan proses penimbunan nanah. Warna hijau ini dikarenakan adanya verdoperoksidase yg dihasilkan oleh bakteri dalam sputum. Ditemukan pada Bronkhiektasis
- Sputum merah muda dan berbusa kemungkinan tanda **edema paru akut**.

- Sputum berlendir, pekat, abu-abu/putih kemungkinan tanda **bronkitis kronik**.
- Sputum berbau busuk kemungkinan tanda **abses paru/ bronkiektasis**.

Cara pengumpulan spesimen urine

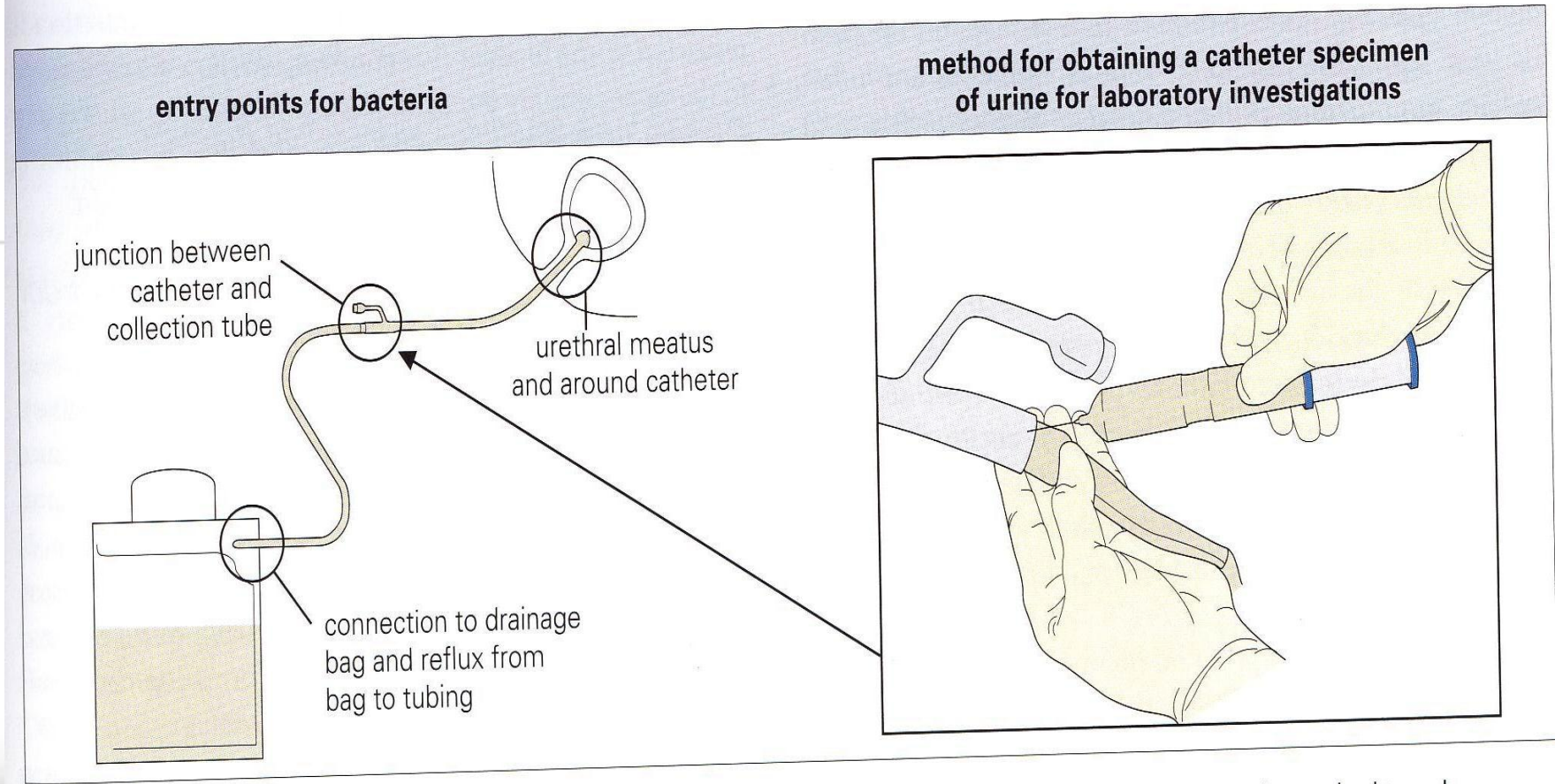
1. *Mid stream urine (Clean catch urine)*

- urine pertama di pagi hari
- spesimen dikumpulkan di pertengahan urine dikeluarkan



A **B**
FIGURE 2-3. Midstream clean-catch urine collection. (A) The labia are separated with the fingers and cleansed with a 4 × 4-inch gauze pad saturated with green soap. The midstream portion of the urine is collected into a sterile container (B).

Cara pengambilan urine kateter



Urine supra pubic puncture

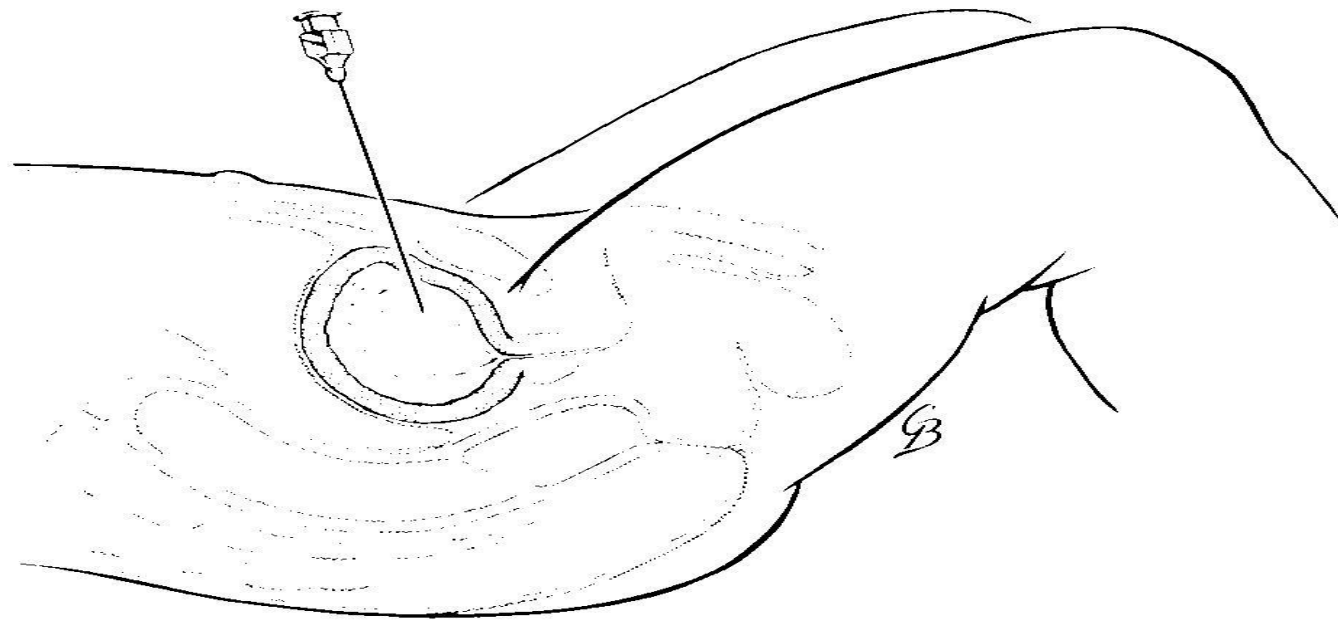


FIGURE 2-4. Suprapubic urinary bladder aspiration. A needle is directed percutaneously into the urinary bladder just above the symphysis pubis. Urine can be removed with a syringe.

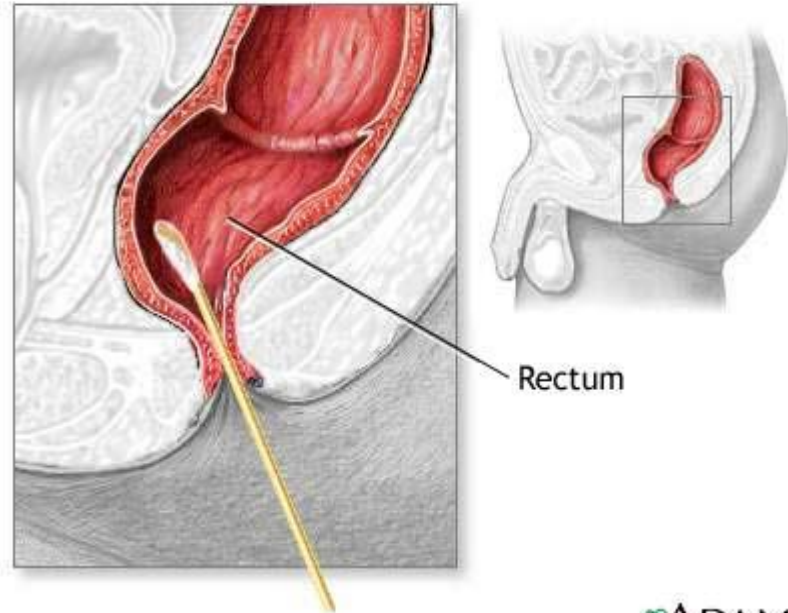
Volume darah

- **Bayi : 1-3 ml.**
- **Anak-anak: 3-5 ml**
- **Dewasa:10-20 ml**



SPEKIMEN SALURAN CERNA

- **Spesimen feses**
- **Usap rectal (*rectal swab*)**
- **medium transport Carry-Blair**



PENYIMPANAN SPECIMEN

- **Wadah:** steril dan bisa ditutup rapat (botol bertutup sekrup).
- **Waktu penyimpanan :** harus segera diproses, tdk boleh lebih dari 24 jam.
- **Temperatur :** tergantung bakteri yg dicurigai : 4°C, suhu kamar.
- **BI perlu :** medium transport

TRANSPORTASI SPECIMEN

- **Harus dalam lingkungan yang cocok untuk bakteri yang dicurigai.**
 - med. Transport
 - Suhu kamar /termos berisi es
- **Wadah tidak boleh dibawa dengan tangan telanjang.**
- **Jarak jauh : “ BERISI BAHAN YG MENGANDUNG PENYEBAB PENYAKIT “.**

Faktor –faktor yang berpengaruh atas hasil kultur

- Sampel yang salah
 - Sputum – didapat saliva
- Terlambat kirim
 - LCS
- Pertumbuhan kontaminan
 - Misal kultur darah
- Pasien sudah mendapatkan antibiotika

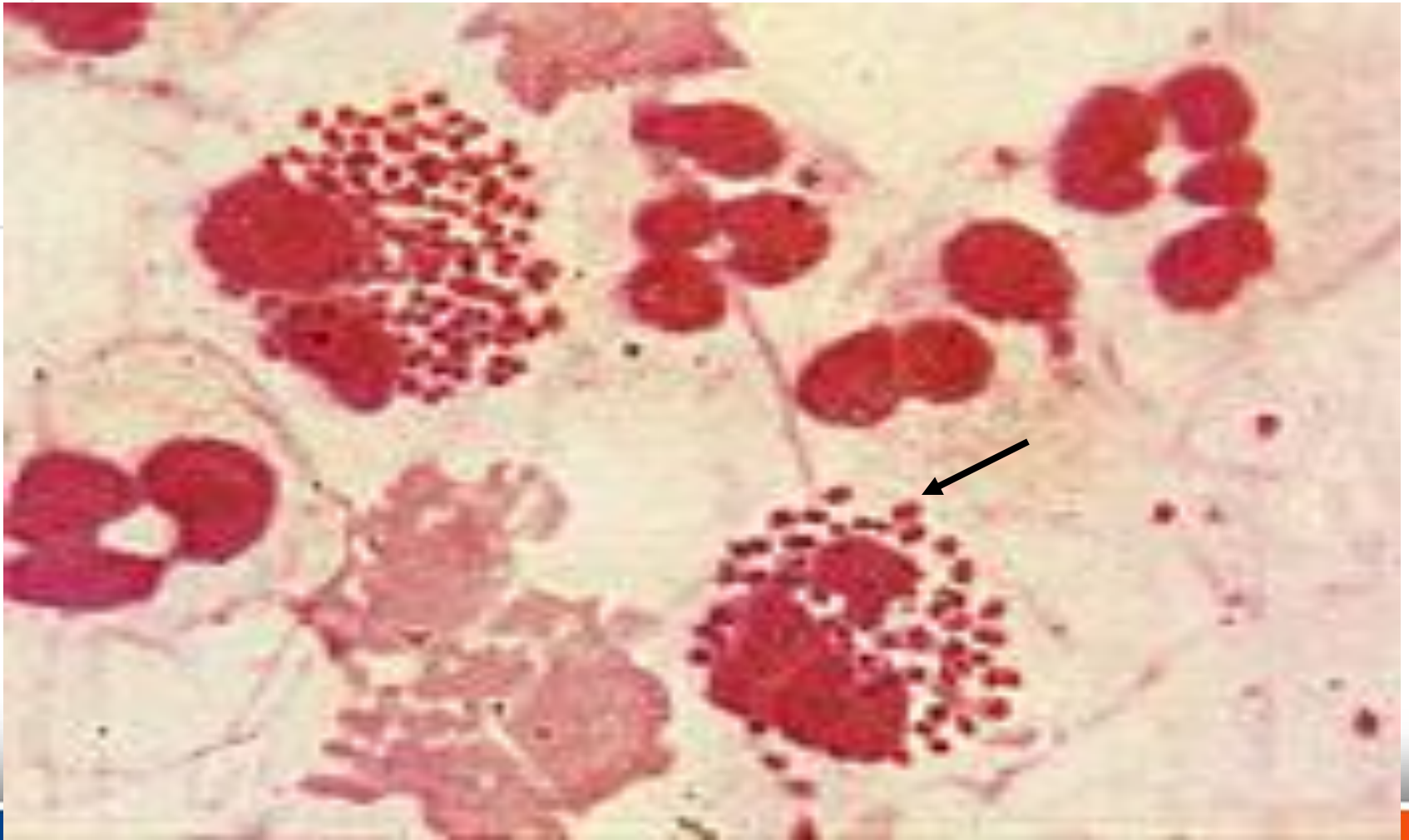
1. MIKROSKOPIS LANGSUNG

- Bakteri spesifik yang ada pada spesimen, untuk dapat terlihat langsung dibawah mikroskop minimal jumlahnya ada 10^5 /ml
- Dapat membantu diagnosis cepat untuk bakteri spesifik seperti :
 - Neisseria gonorrhoe***,***Neisseria meningitidis*** pada pewarnaan Gram: diplococcus Gram negatif
 - Mycobacterium tuberculosis*** dan ***M.leprae*** pada pewarnaan Ziehl Neelsen: BTA positif

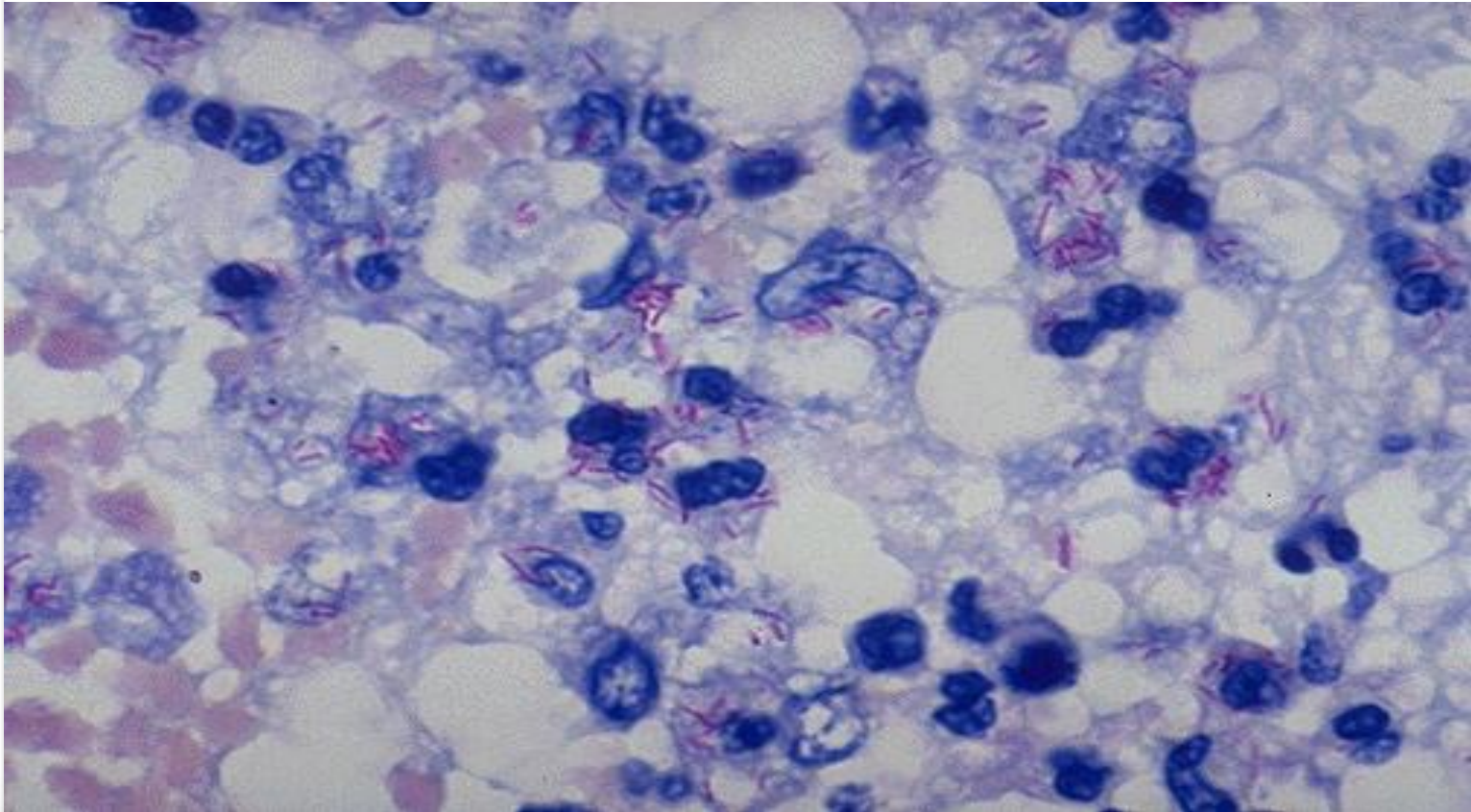
Mycobacterium tuberculosis



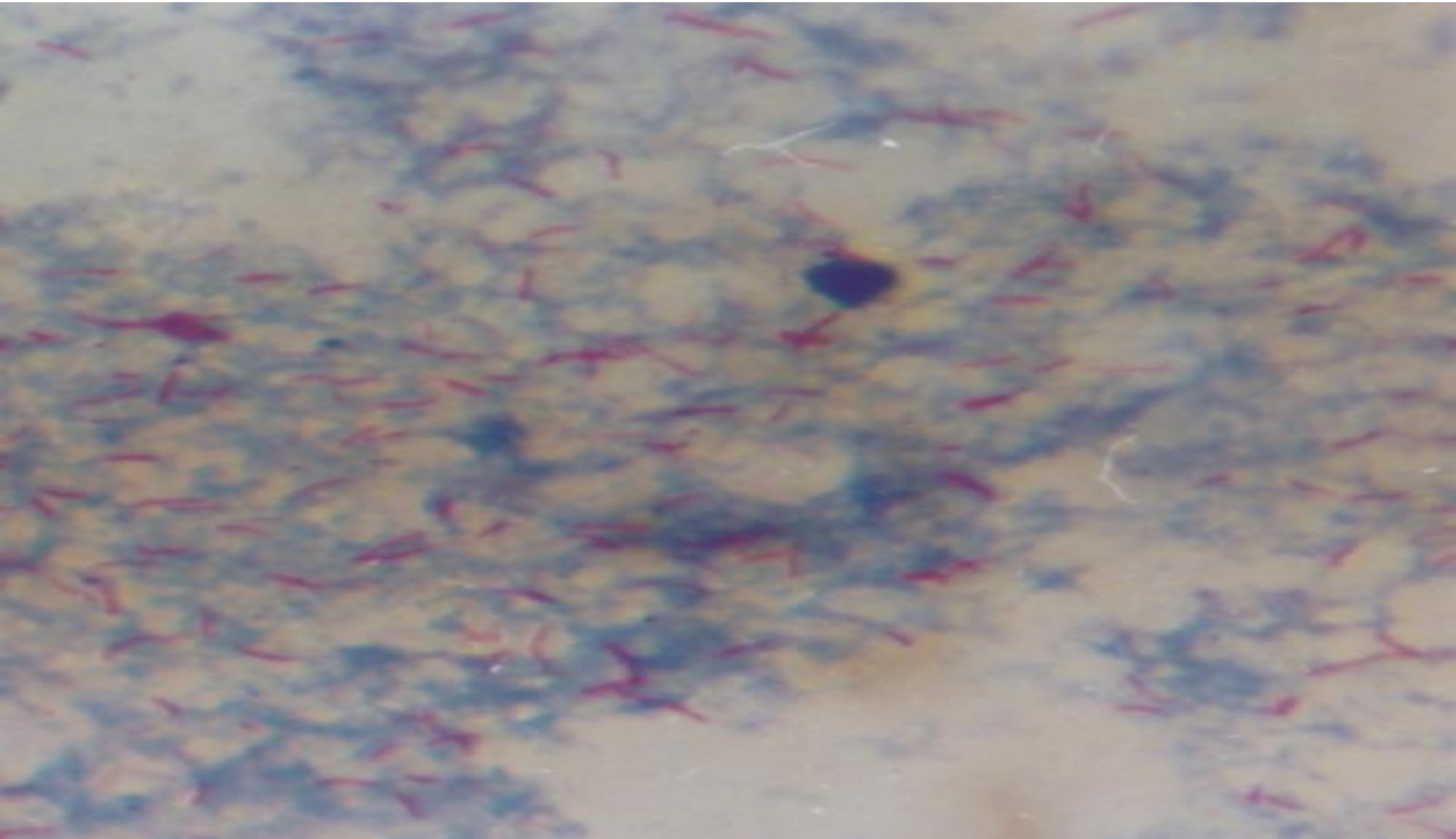
Diplococcus Gram negatif



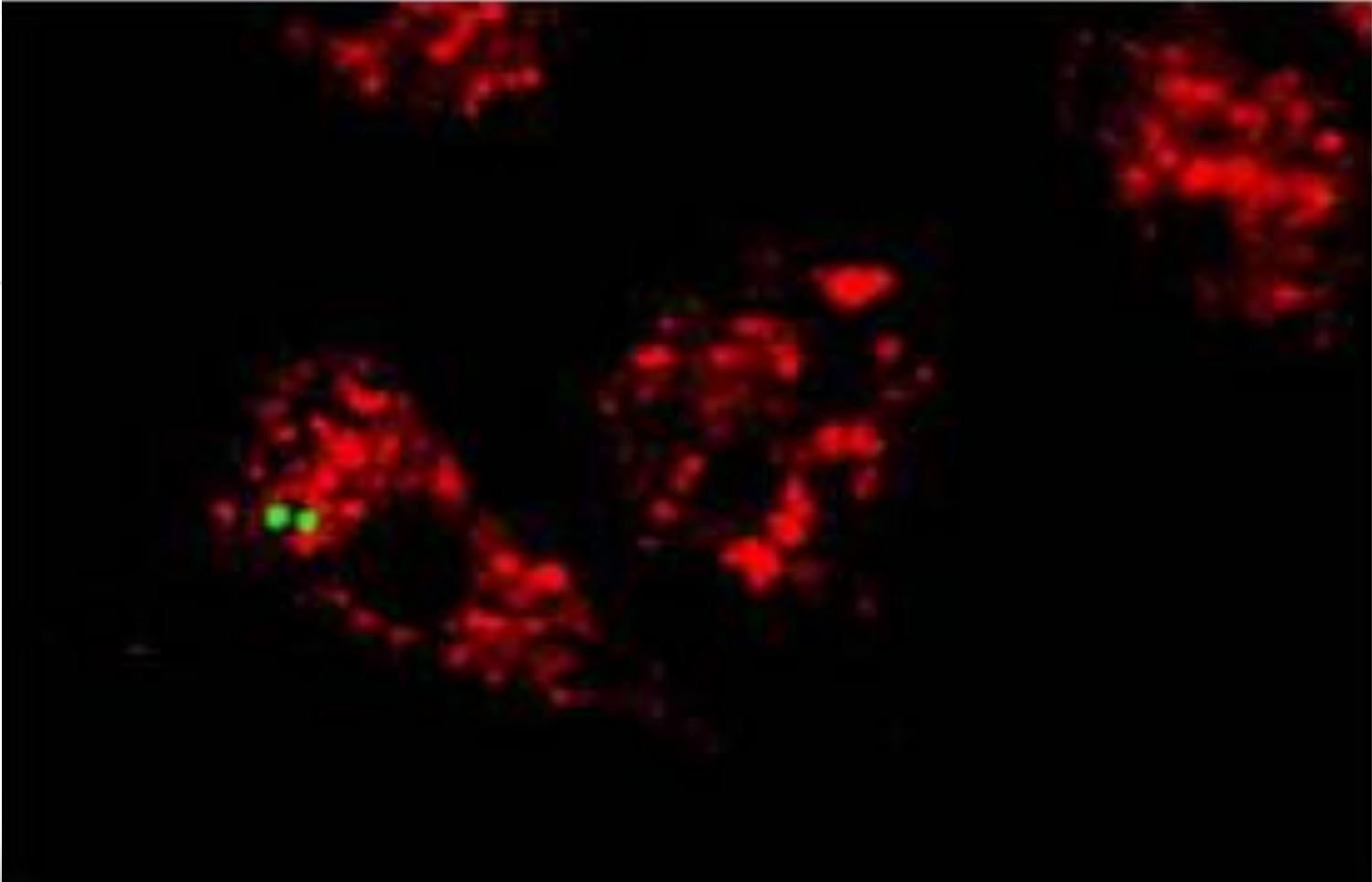
Pewarnaan Tahan Asam



PEWARNAAN Ziehl Neelsen SESUDAH DEKONTAMINASI



Pewarnaan Fluorescence



2. Biakan / kultur

- Memakai media agar :
 - media cair ; untuk perbenihan
 - media padat : tumbuh koloni !

- Media pertumbuhan mikroorganismenya adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganismenya untuk pertumbuhannya.



Media (cair, padat, semisolid)



Inoculating Loop

- The inoculating loop should be held comfortably, much as you would hold a pencil.



Medium :

lingkungan buatan yang dipakai untuk mempertahankan kehidupan dan mengembang-biakkan bakteri di luara tubuh inang

Koloni :

massa pertumbuhan bakteri di atas permukaan medium padat

Koloni tersendiri (isolated colony):

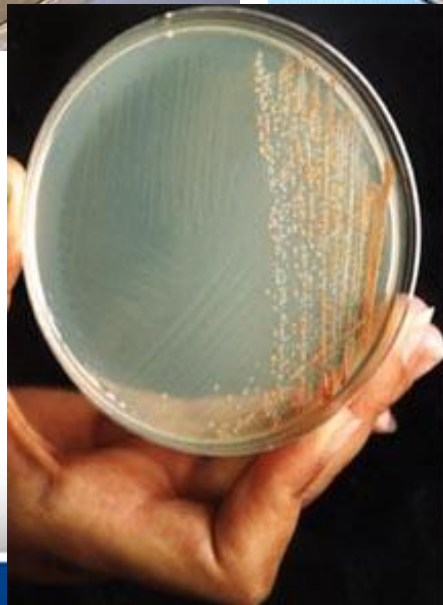
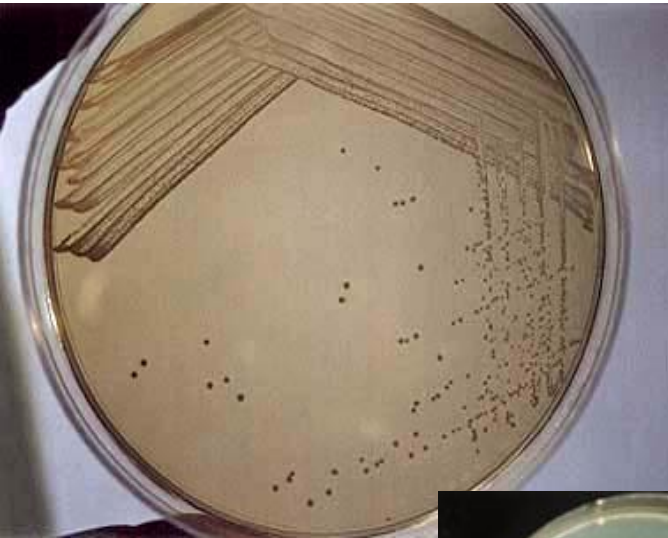
koloni yg terpisah, yg merupakan turunan dri satu sel bakteri.

Koloni:

massa pertumbuhan bakteri di atas medium padat yg berasal dr satu sel bakteri



Streak plate method of isolation



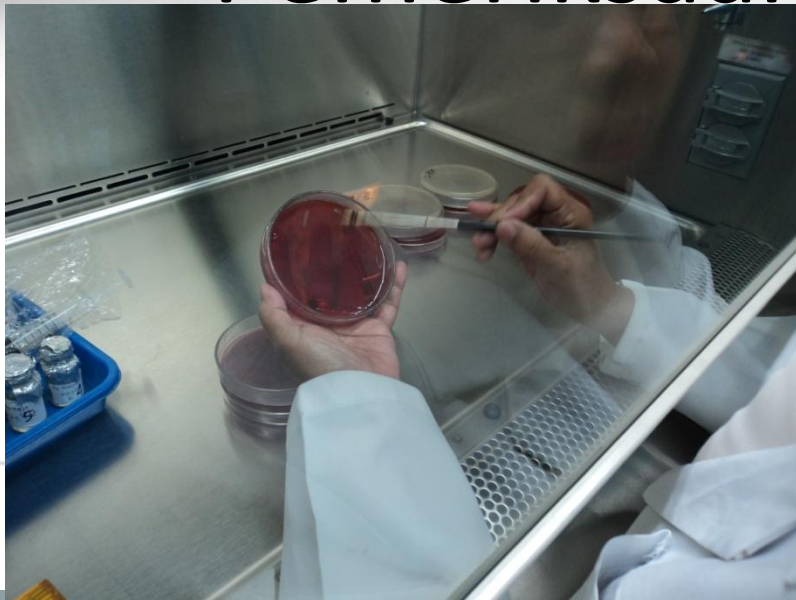
E. coli w/ *S. marcescens*







Pemeriksaan Kultur Darah



B. Identifikasi dari biakan

- 1. Gambaran koloni**
- 2. Gram: Morfologi & sifat Gram**
- 3. Gerakan pd medium padat atau semi-solid**
- 4. Sifat-sifat biokimia**
- 5. Identifikasi makromolekul: Ag, Ab dan DNA/RNA**

Identifikasi koloni kuman

COLONIAL MORPHOLOGY

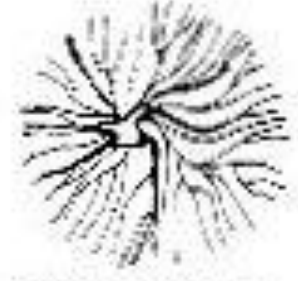
SHAPE OF COLONY



round



irregular



filamentous



rhizoid



curled

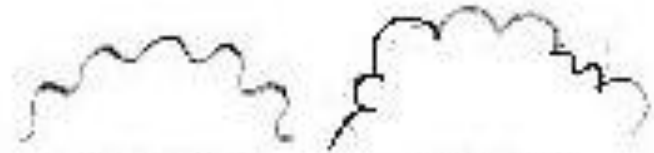
EDGE



entire



filamentous

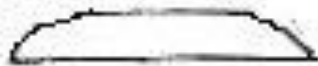


undulate

lobate

irregular

ELEVATION



raised



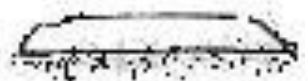
flat



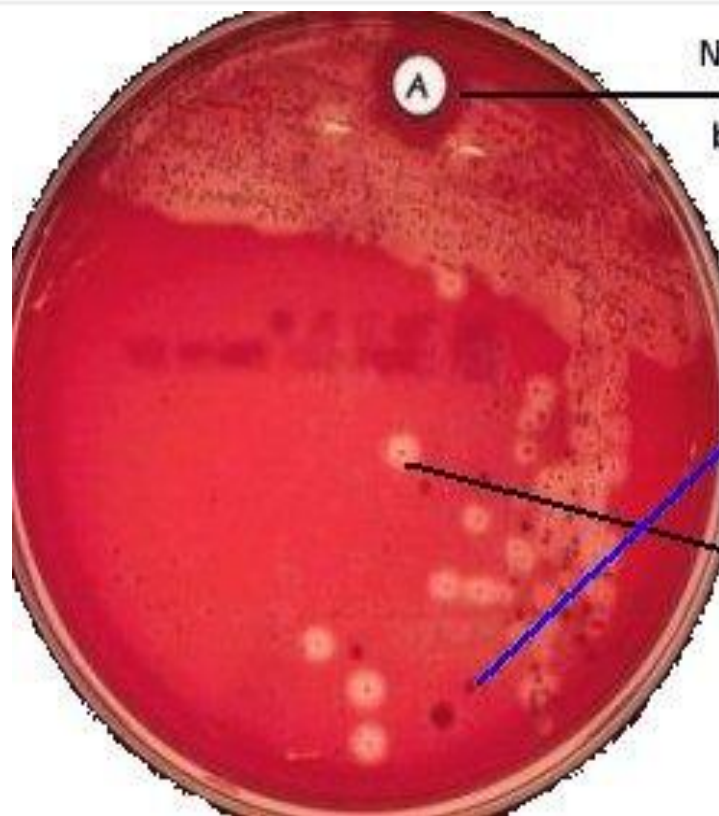
convex



umbonate



growth into medium



Notice the zone of growth inhibition around the bacitracin (Taxo A disc).

A throat culture taken from a 5 year-old with Streptococcal pharyngitis.

Notice the non-hemolytic bacterial colonies

Notice the clear zone of hemolysis around the *Streptococcus pyogenes* grown on a blood agar plate.



Tes-tes biokimia

1. Metabolisme KH

- Tes peragian gula-gula, Tes VP-MR

2. Metabolisme protein

- Tes indol

3. Metabolisme lemak (jarang)

4. Penggunaan zat tertentu

- Tes citrat

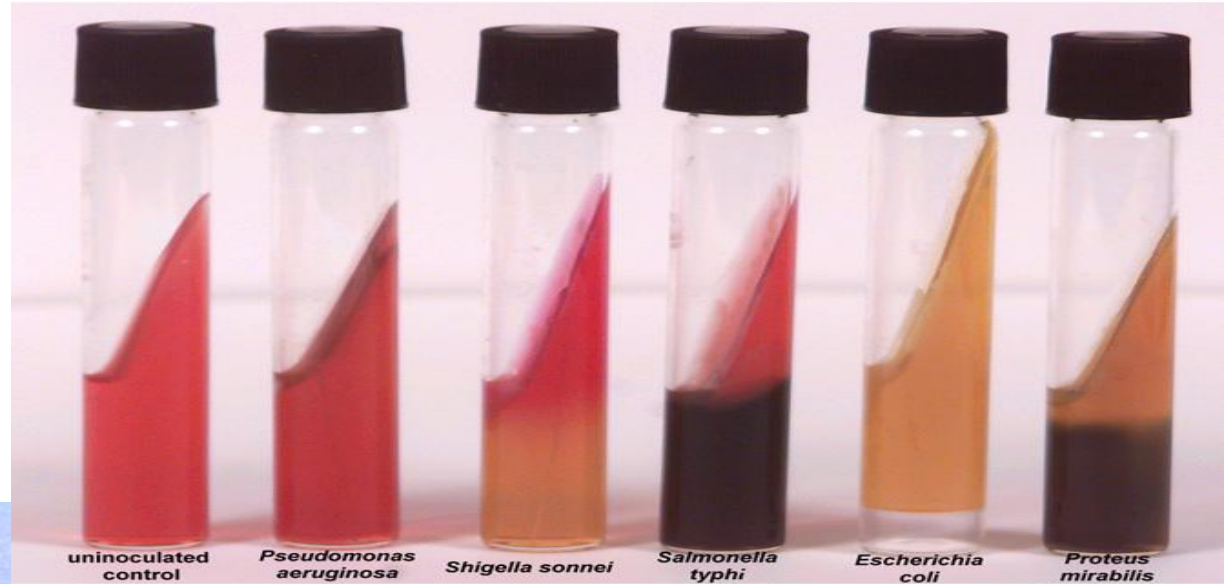
5. Dihasilkannya zat tertentu

- Tes katalase, tes koagulase

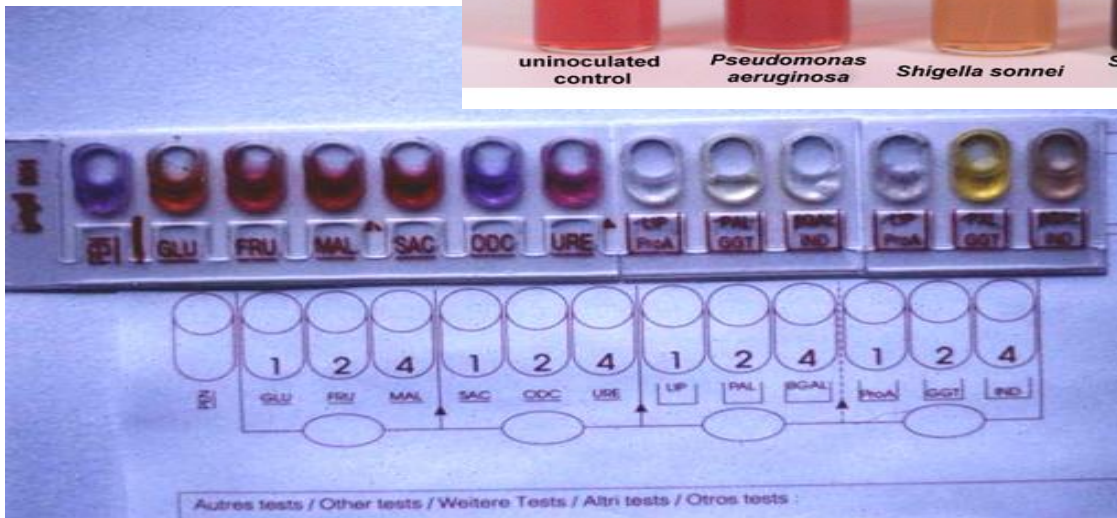
Uji lanjutan dari koloni tersangka

- Reaksi biokimia;
 - Tes fermentase gula
 - tes motilitas
 - methil red, VP,citrat dll
- Tes oksidase
- Tes katalase

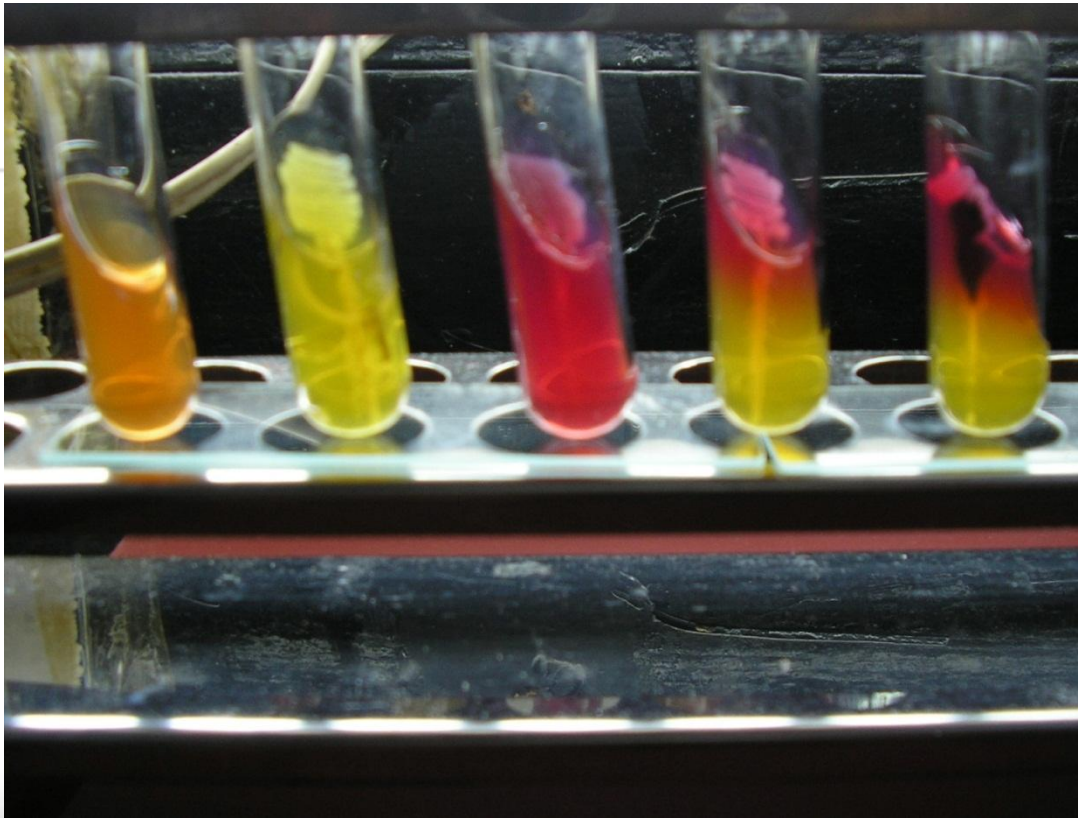
BIOCHEMICAL PROPERTIES



ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain



Tes fermentasi gula



ELISA

(Enzym-linked immunosorbent Assay)

1. Solid phase ELISA

a. Direct

b. Indirect

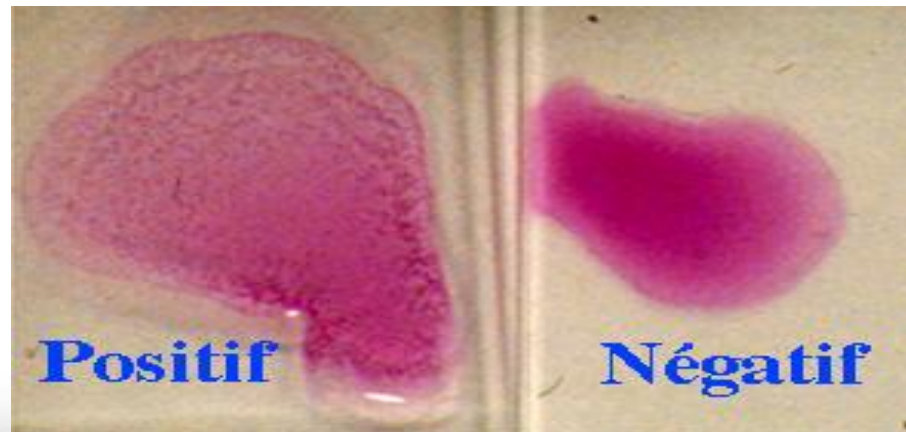
Kualitatif dan kuantitatif

2. Membrane bound SPIA

Lebih mudah & murah

Kualitatif

Latex Agglutination



- **4. Diagnosis molekuler**

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DETEKSI DNA / RNA

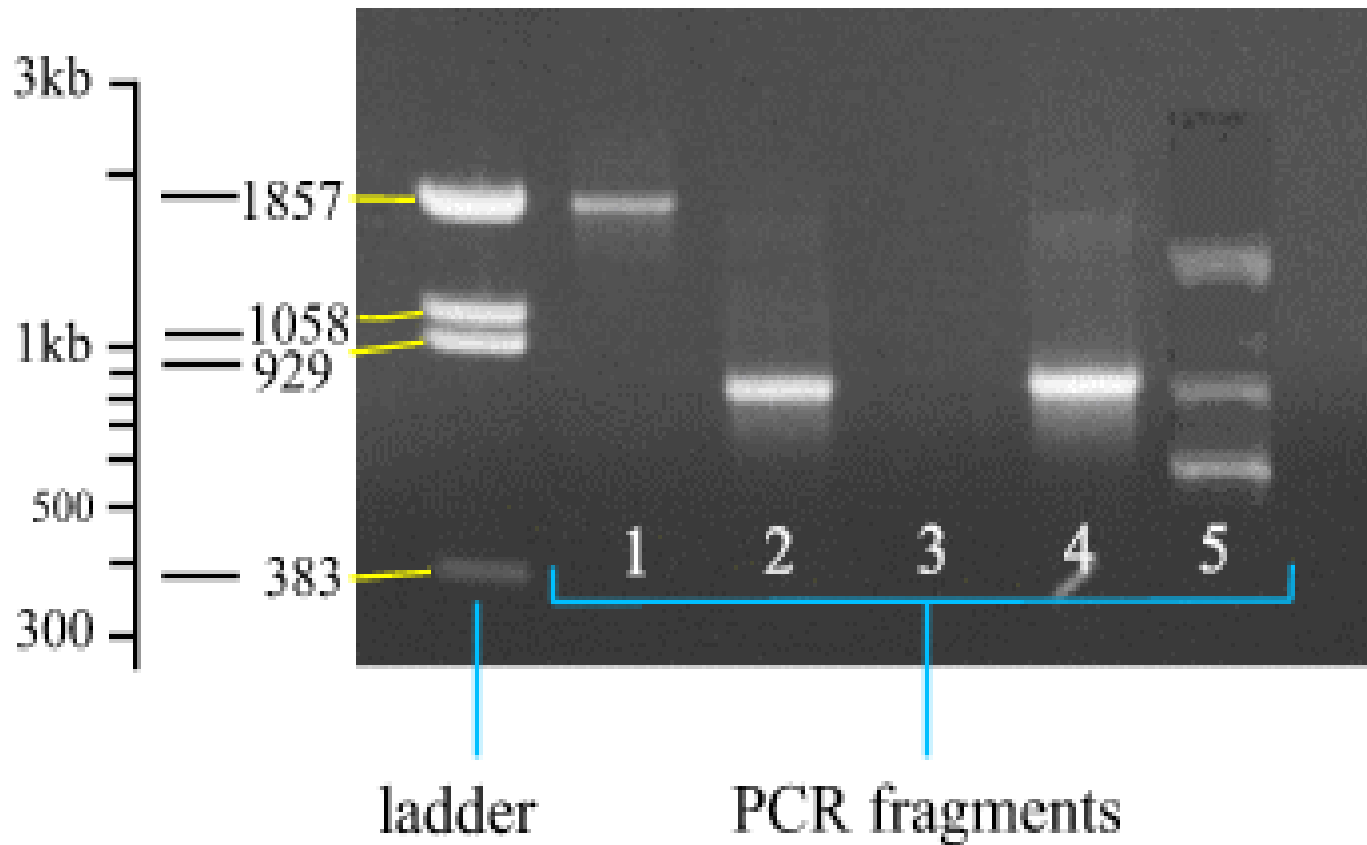
1. Gen-Probe (Hibridisasi)

- DNA tidak diperbanyak
- banding PCR kurang sensitif

2. Polymerase chain reaction (PCR)

- DNA diperbanyak
- sangat sensitif
- Lebih mahal dari Gen-Probe

Verification of PCR product on agarose or separide gel



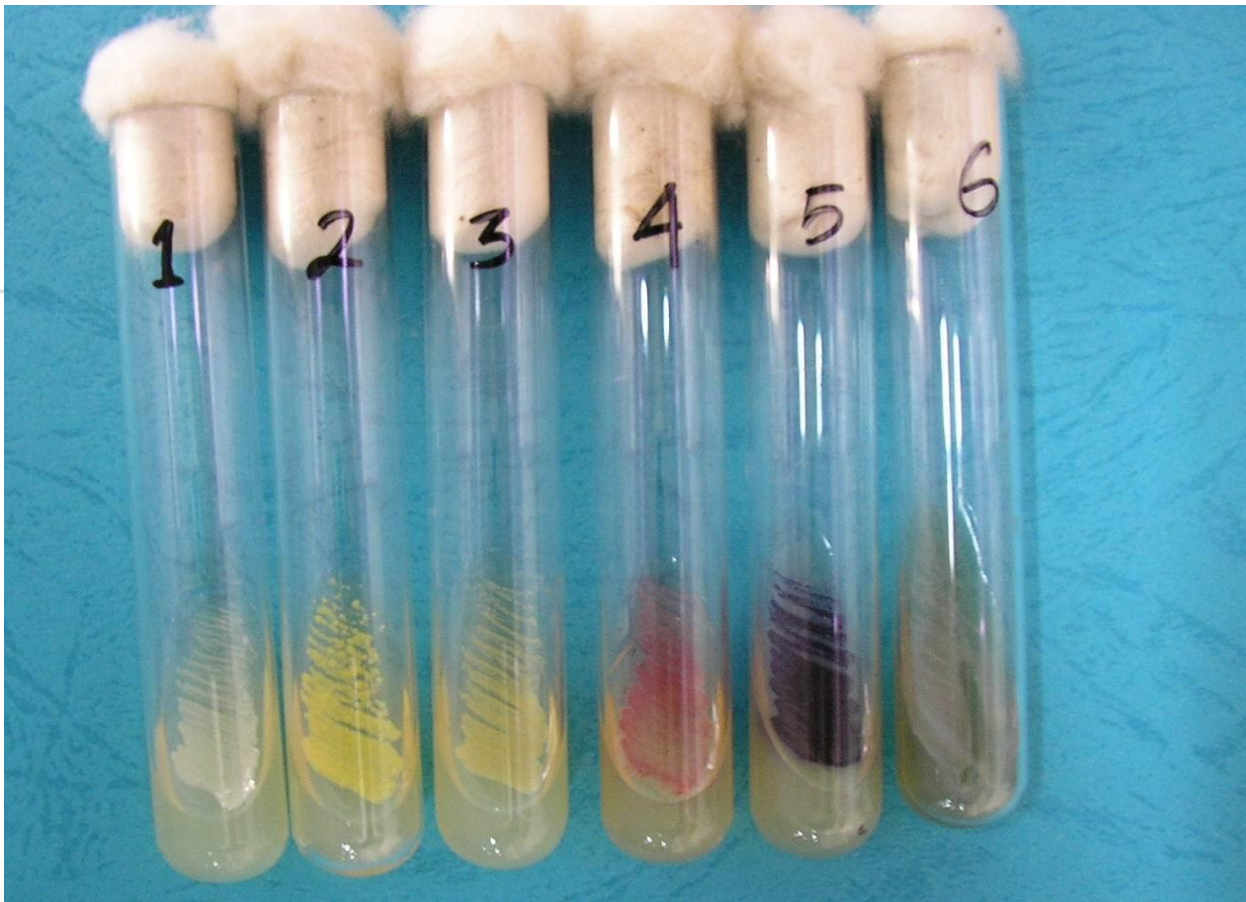
RESISTENSI BAKTERI



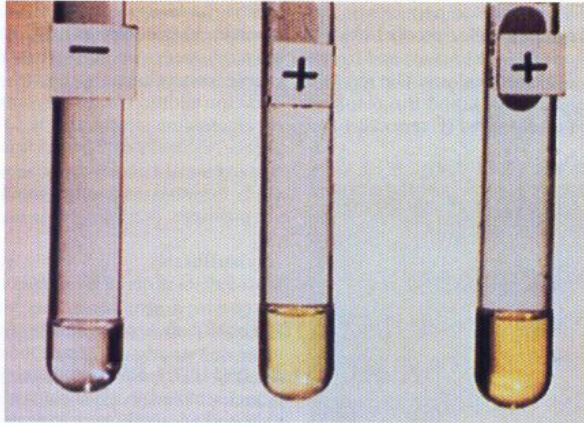
SENSITIVITY TEST

Dihasilkan enzim DNAse test

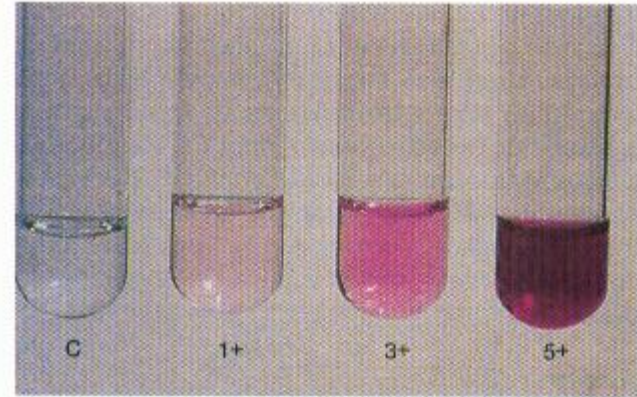




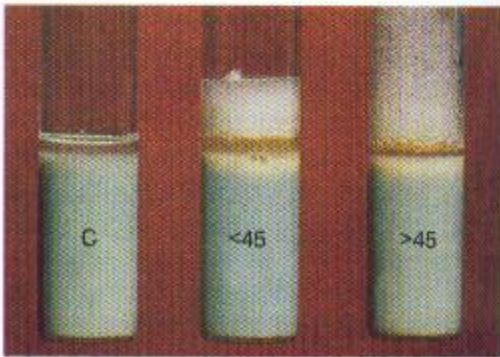
Tes Biokimia



Tes Niacin (+) : M. tbc

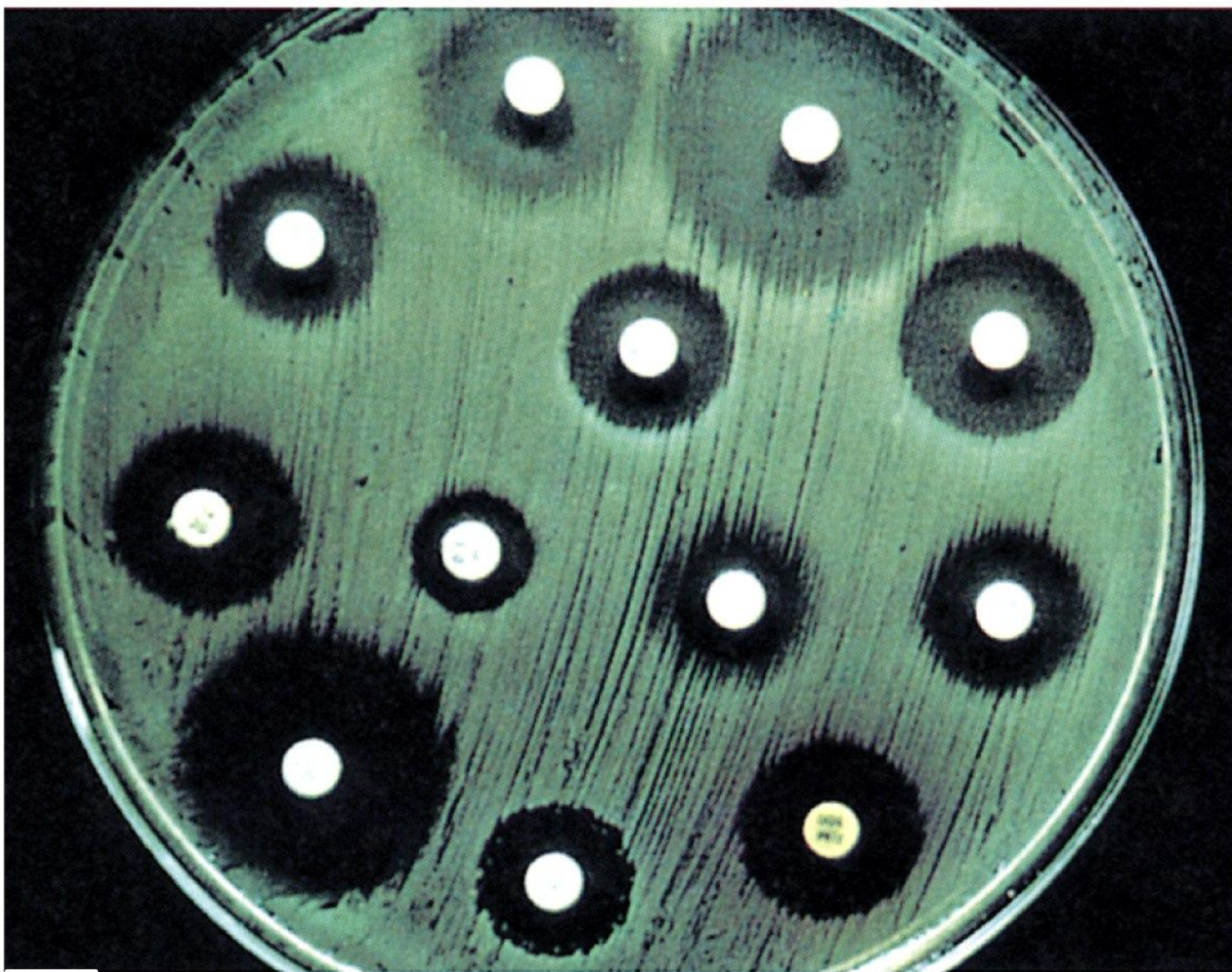


Reduksi Nitrat (+) : M. tbc



Tes Katalase : (+) → sensitif INH

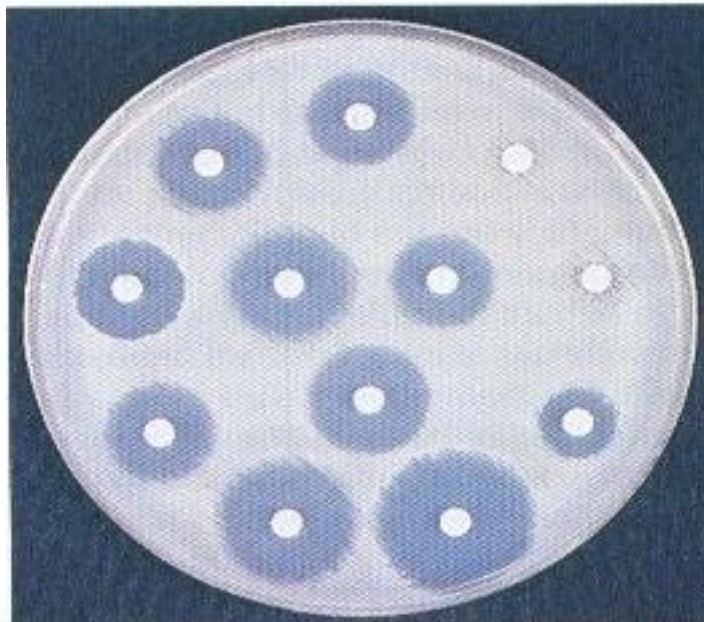




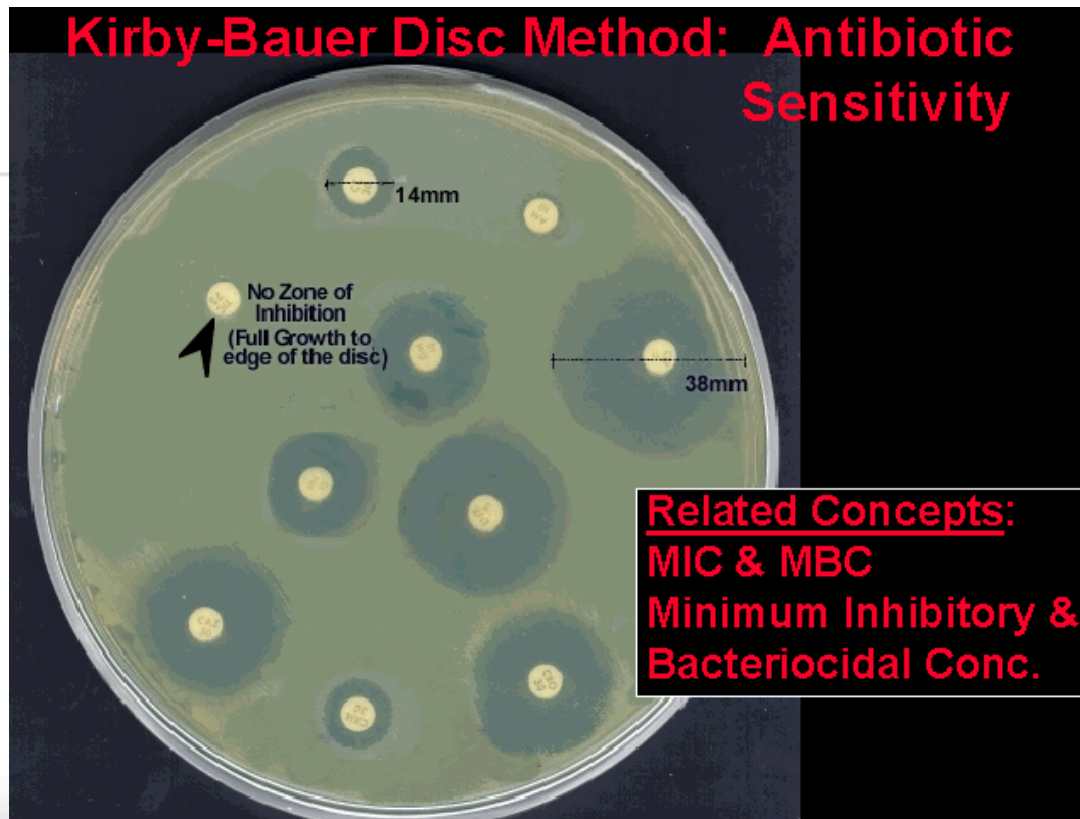
Miles/ScienceVu

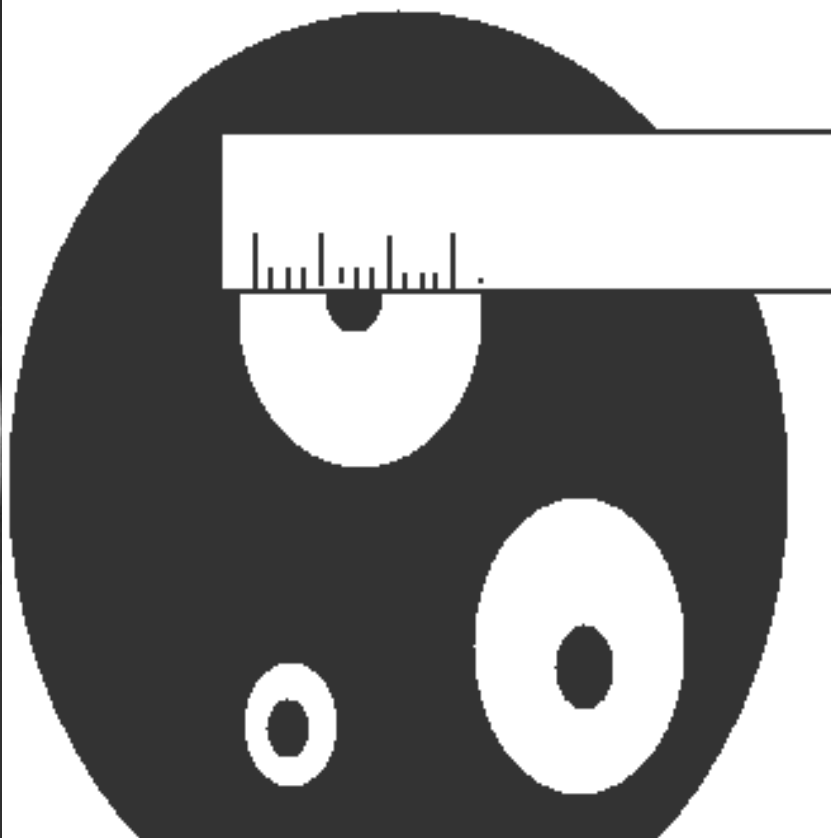
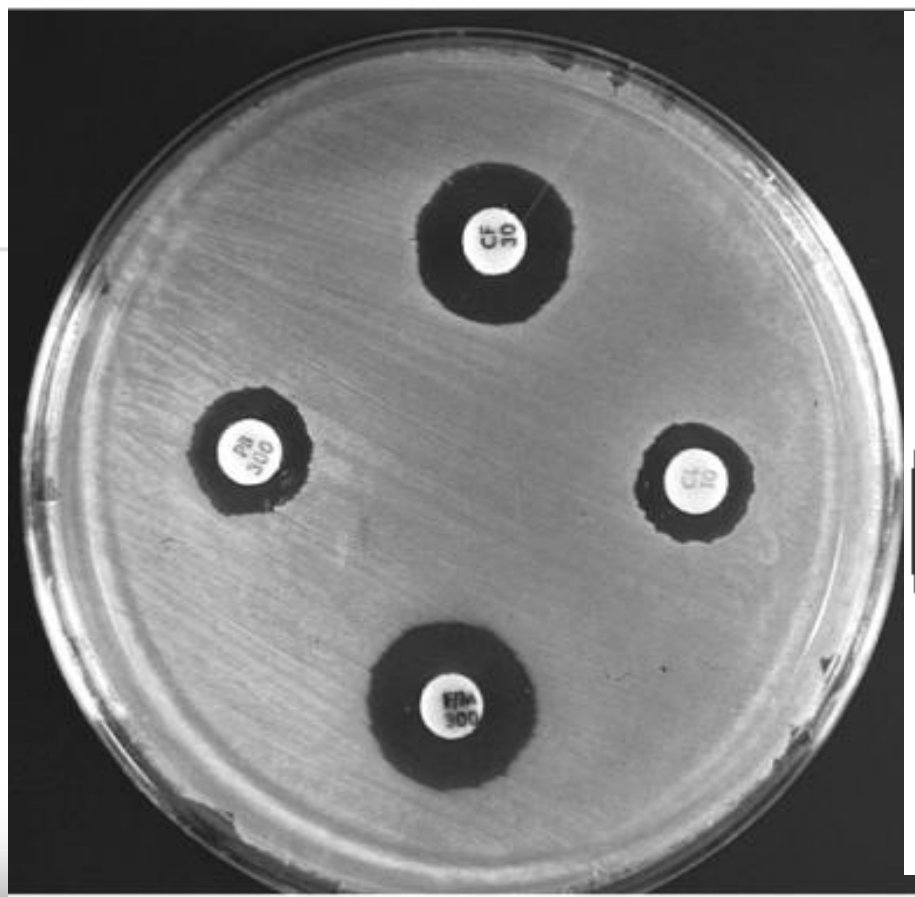
1. Metode Dilusi

2. Metode Disk Difusi



Resistensi /sensitivity tes





Isolat kuman dari material darah penderita yang dirawat di
PICU RS Dr Kariadi 2005-2006

| No. | Microorganisms | 2005 | | 2006 | |
|-----|------------------------|------|------|------|------|
| | | % | Rank | % | Rank |
| 1. | <i>E.coli</i> | 28 | 1 | 19 | 6 |
| 2. | <i>K.pneum.</i> | 23 | 2 | 20 | 5 |
| 3. | <i>S.aureus/MRSA</i> | 17 | 6 | 21 | 4 |
| 4. | <i>P.aeruginosa</i> | 19 | 4 | 23 | 3 |
| 5. | <i>E.aerogenes</i> | 18 | 5 | 27 | 2 |
| 6. | <i>S.epid./MRSE</i> | 20 | 3 | 29 | 1 |
| 7. | <i>Proteus spp.</i> | 15 | 7 | 11 | 8 |
| 8. | <i>Candida</i> | 12 | 9 | 15 | 7 |
| 9. | <i>Acinetobac. spp</i> | 14 | 8 | 9 | 9 |

Nosocomial Infection Surveillance, Dr Kariadi Hospital, 2007

Isolat kuman dari material darah penderita yang dirawat di NICU RS Dr Kariadi 2005-2006

| No. | Microorganisms | 2005 | | 2006 | |
|-----|---------------------------|------|------|------|------|
| | | % | Rank | % | Rank |
| 1. | <i>E.aerogenes</i> | 22 | 2 | 32 | 1 |
| 2. | <i>K.pneumoniae</i> | 19 | 4 | 15 | 6 |
| 3. | <i>S.epidermidis/MRSE</i> | 45 | 1 | 30 | 2 |
| 4. | <i>S.aureus/MRSA</i> | 18 | 5 | 19 | 4 |
| 5. | <i>E.coli</i> | 14 | 7 | 18 | 5 |
| 6. | <i>P.aeruginosa</i> | 21 | 3 | 23 | 3 |
| 7. | <i>Proteus spp.</i> | 11 | 8 | 13 | 8 |
| 8. | <i>Candida</i> | 15 | 6 | 14 | 7 |

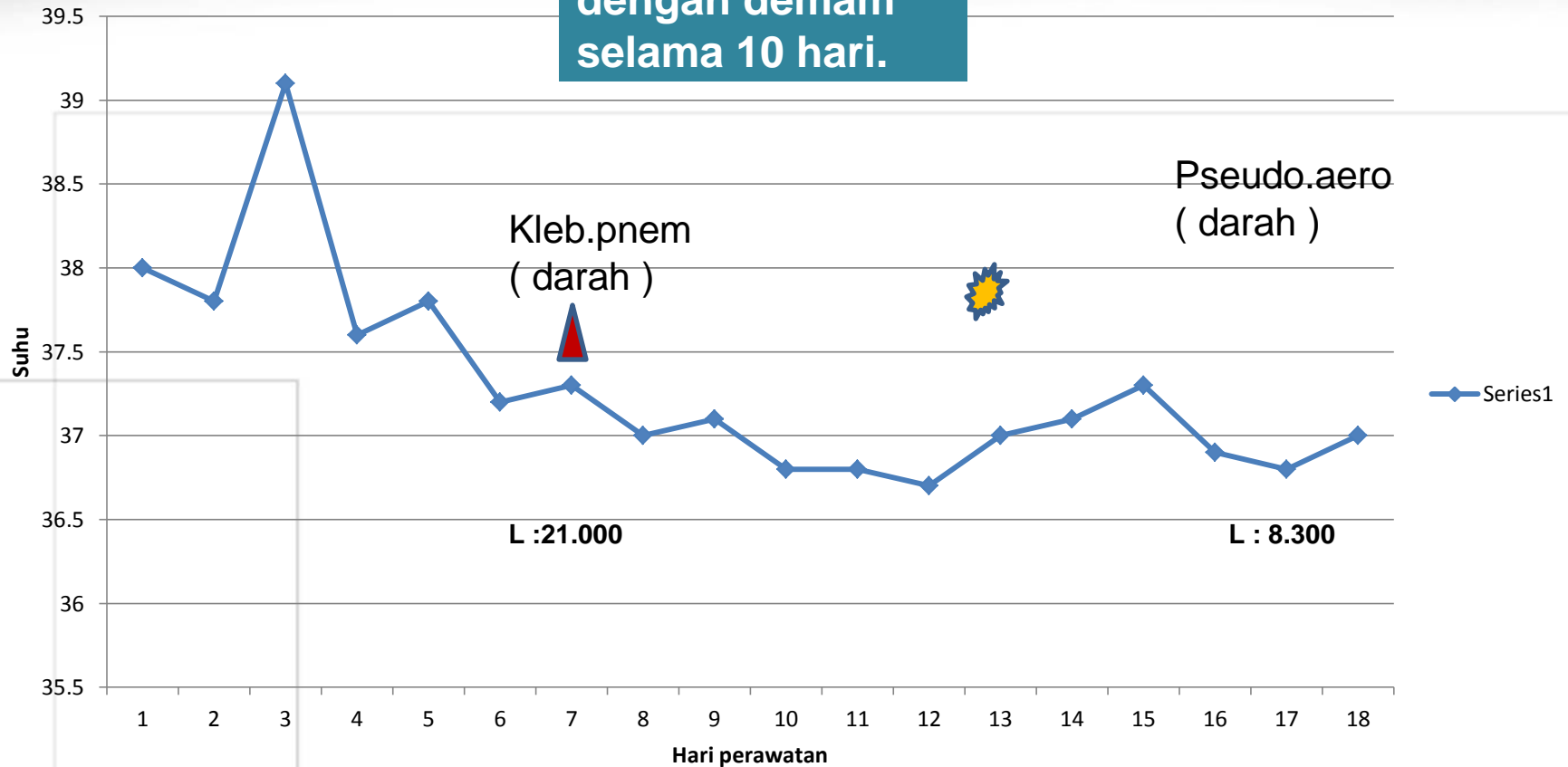
Nosocomial Infection Surveillance, Dr Kariadi Hospital, 2007

Hasil Kultur Darah Ruang Anak RSDK

| Kuman | Jumlah | Prosentase |
|----------------------------|--------|---------------|
| Candida albicans | 1 | 0.45 % |
| Enterobacter aerogenes | 86 | 38.7 % |
| Escherichia coli | 14 | 6.3 % |
| Pseudomonas aeruginosa | 26 | 11.7 % |
| Salmonella typhi | 4 | 1.8 % |
| Staphylococcus aureus | 28 | 12.6 % |
| Staphylococcus epidermidis | 61 | 27.4 % |
| Streptococcus pneumoniae | 2 | 0.9 % |

Perjalanan anak dengan sepsis

Pasien sepsis dengan demam selama 10 hari.



Ampi-sulbactam

Amikasin

- **TERIMA KASIH**