

Morphological Identification of Bacteria in Sputum Samples Using Gram Staining

Identifikasi Morfologi Bakteri pada Sampel Sputum Menggunakan Pewarnaan Gram

Yoana Marizky Siregar¹, Violita^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: violita@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Lower respiratory tract infections remain a major cause of morbidity and mortality, particularly in regions with limited diagnostic facilities. This study aimed to identify bacterial morphology in patient sputum samples using Gram staining through a descriptive observational approach conducted at the RSUD Pandan Laboratory in early 2025. Gram staining was performed using crystal violet, Lugol's iodine, alcohol-acetone, and safranin, followed by microscopic observation at 1000× magnification. The results demonstrated the presence of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-positive cocci arranged in clusters and Gram-negative bacilli with various morphological patterns were observed, indicating bacterial groups commonly associated with respiratory tract infections. This microscopic technique enabled early morphological characterization of potential respiratory pathogens and provided supportive information for empirical antibiotic consideration. Although Gram staining cannot determine bacterial identity at the species level, it remains a rapid, affordable, and practical diagnostic method, particularly in healthcare facilities with limited laboratory infrastructure.

Key words *respiratory infection, microscopy, bacterial morphology, Gram staini, sputum*

Abstrak

Infeksi saluran pernapasan bawah masih menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas, terutama di wilayah dengan keterbatasan fasilitas diagnostik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi morfologi bakteri pada sampel sputum pasien menggunakan teknik pewarnaan Gram dengan pendekatan deskriptif observasional yang dilakukan di Laboratorium RSUD Pandan pada awal tahun 2025. Pewarnaan Gram dilakukan menggunakan kristal violet, lugol, alkohol-aseton, dan safranin, kemudian diamati secara mikroskopis pada pembesaran 1000×. Hasil penelitian menunjukkan keberadaan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Bakteri Gram-positif berbentuk kokus dengan susunan berkelompok serta bakteri Gram-negatif berbentuk basil dengan variasi morfologi teramati, yang mengindikasikan kelompok bakteri yang umum berasosiasi dengan infeksi saluran pernapasan. Teknik mikroskopis ini memungkinkan karakterisasi morfologi awal patogen pernapasan dan dapat mendukung pertimbangan terapi antibiotik empiris. Meskipun pewarnaan Gram tidak mampu mengidentifikasi bakteri hingga tingkat spesies, metode ini tetap

relevan sebagai alat diagnostik yang cepat, murah, dan praktis, khususnya di fasilitas kesehatan dengan keterbatasan sarana laboratorium.

Kata kunci infeksi pernapasan, mikroskopis, morfologi bakteri, pewarnaan Gram, sputum

Pendahuluan

Infeksi saluran pernapasan merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di Indonesia, terutama di wilayah dengan keterbatasan fasilitas laboratorium dan diagnostik lanjutan. Pneumonia, bronkitis, dan berbagai infeksi saluran napas bawah lainnya masih menjadi penyebab dominan rawat inap dan kematian, khususnya pada kelompok anak-anak dan lanjut usia (Petti dkk., 2021). Oleh karena itu, penanganan yang cepat dan tepat sangat diperlukan untuk menurunkan angka kematian serta meningkatkan efektivitas terapi klinis.

Salah satu metode diagnostik awal yang banyak digunakan dalam mikrobiologi klinik adalah teknik pewarnaan Gram. Teknik ini pertama kali diperkenalkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884 dan hingga kini masih digunakan secara luas karena kemampuannya membedakan bakteri berdasarkan struktur dinding sel (Tortora dkk., 2020). Pewarnaan Gram mengelompokkan bakteri menjadi Gram-positif dan Gram-negatif berdasarkan kemampuan dinding sel dalam mempertahankan pewarna kristal violet setelah proses dekolorisasi. Perbedaan ini berkaitan erat dengan ketebalan lapisan peptidoglikan dan memiliki implikasi penting dalam pendekatan terapi antibiotik empiris (Baron dkk., 2013).

Selain berfungsi dalam klasifikasi awal bakteri, pewarnaan Gram juga berperan dalam menilai kualitas sampel sputum. Sampel sputum yang berasal dari saluran napas bawah umumnya mengandung sedikit sel epitel skuamosa dan lebih banyak sel inflamasi, seperti neutrofil, yang mengindikasikan adanya proses infeksi aktif (Tan dkk., 2020). Pemeriksaan ini membantu memastikan bahwa sampel yang dianalisis representatif terhadap kondisi patologis pasien.

Pengamatan morfologi bakteri melalui mikroskop setelah pewarnaan Gram memberikan informasi awal mengenai kelompok bakteri penyebab infeksi. Misalnya, bakteri berbentuk kokus Gram-positif yang tersusun berkelompok serta basil Gram-negatif dengan berbagai pola susunan sering ditemukan pada infeksi saluran pernapasan (Sibanda dkk., 2020; Kumar dkk., 2020). Informasi ini sangat penting dalam praktik klinik, terutama di fasilitas kesehatan dengan keterbatasan pemeriksaan kultur dan uji kepekaan antibiotik. Pendekatan identifikasi awal berbasis karakter morfologi dan pewarnaan juga banyak digunakan dalam penelitian mikrobiologi sebagai dasar eksplorasi potensi agen antimikroba dan pengendalian infeksi (Handayani dkk., 2021; Mulia dkk., 2023).

Meskipun pewarnaan Gram tidak dapat menggantikan metode kultur atau pemeriksaan molekuler dalam penentuan spesies bakteri secara pasti, teknik ini tetap menjadi alat diagnostik yang esensial karena cepat, ekonomis, dan mudah diterapkan (Baron dkk., 2022). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi morfologi bakteri pada sampel sputum pasien melalui pewarnaan Gram serta memberikan gambaran awal kelompok bakteri yang berpotensi terlibat dalam infeksi saluran pernapasan.

Bahan dan Metode

Lokasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan pendekatan observasional. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium RSUD Pandan pada bulan Januari–Februari 2025.

Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan meliputi sampel sputum pasien, kaca objek, reagen pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol–aseton, dan safranin), mikroskop binokuler, bunsen, dan akuades.

Prosedur Penelitian

a. Persiapan Preparat

Sampel sputum dioleskan secara merata dan tipis pada kaca objek yang bersih untuk mencegah penumpukan sel yang dapat mengganggu pengamatan. Apusan kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api (pemanasan) beberapa kali. Langkah ini bertujuan untuk mematikan bakteri dan melekatkan sel pada kaca objek agar tidak terbasuh selama proses pewarnaan.

b. Pewarnaan Gram

Preparat ditetesi kristal violet selama 60 detik, dibilas dengan air, kemudian ditambahkan larutan lugol selama 30 detik. Setelah pembilasan, preparat didekolorisasi menggunakan alkohol–aseton hingga warna tidak lagi luntur, lalu dibilas kembali. Pewarnaan kontras dilakukan dengan safranin selama 10 detik, diikuti pembilasan dan pengeringan.

c. Pengamatan Mikroskopis

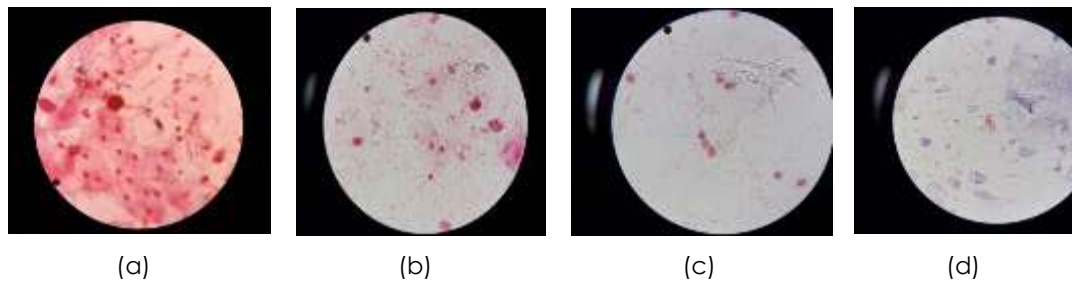
Preparat yang telah kering diamati di bawah mikroskop cahaya. Pengamatan dimulai dari perbesaran rendah untuk mencari lapang pandang, kemudian dilanjutkan ke perbesaran 1000× dengan penambahan minyak imersi. Minyak ini berfungsi meningkatkan indeks bias cahaya sehingga bayangan sel bakteri terlihat tajam dan jelas. Fokus pengamatan mencakup identifikasi warna sel (ungu atau merah), bentuk sel (kokus, basil, atau spiral), serta formasi koloninya.

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif dengan mencatat karakteristik morfologi bakteri, meliputi bentuk, warna hasil pewarnaan, dan pola susunan. Hasil analisis dibandingkan dengan literatur untuk menentukan kelompok bakteri yang mungkin terlibat.

Hasil dan Pembahasan

Pengamatan mikroskopis dilakukan terhadap empat preparat sputum pasien yang telah melalui proses pewarnaan Gram. Hasil menunjukkan adanya variasi morfologi bakteri yang mencerminkan keberagaman kelompok bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan.



Gambar 1. Hasil pengamatan mikroskopis pewarnaan gram: (a) Gram-positif, (b) Gram-negatif, (c) Gram-negatif, dan (d) Gram-negatif

Pada preparat Gambar 1(a) tampak bakteri berbentuk kokus yang berwarna ungu tua dan tersusun berkelompok. Warna ungu menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat Gram-positif, yaitu mampu mempertahankan pewarna kristal violet setelah proses dekolorisasi. Sifat ini berkaitan dengan struktur dinding sel Gram-positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal, sehingga kompleks kristal violet-iodin tidak mudah terlepas (Beveridge, 2001). Susunan kokus yang berkelompok merupakan salah satu ciri morfologi yang sering ditemukan pada kelompok bakteri Gram-positif yang berasosiasi dengan infeksi saluran pernapasan, baik sebagai patogen oportunistik maupun sebagai bagian dari flora normal yang dapat menjadi penyebab infeksi pada kondisi tertentu.

Keberadaan bakteri kokus Gram-positif dalam sputum juga memiliki implikasi klinis yang penting. Dalam praktik mikrobiologi klinik, temuan ini sering digunakan sebagai petunjuk awal untuk memperkirakan kemungkinan kelompok bakteri penyebab infeksi dan membantu menentukan pendekatan terapi empiris. Meskipun demikian, identifikasi berdasarkan morfologi dan pewarnaan Gram tidak dapat digunakan sebagai dasar penentuan spesies secara pasti, sehingga hasil ini harus diinterpretasikan secara hati-hati dan dikombinasikan dengan data klinis serta pemeriksaan lanjutan apabila tersedia.

Pada Gambar 1(b), 1(c), dan 1(d) tampak dominasi bakteri berbentuk basil yang berwarna merah muda, yang menandakan sifat Gram-negatif. Bakteri Gram-negatif tidak mampu mempertahankan kristal violet akibat lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dan keberadaan membran luar, sehingga setelah proses dekolorisasi bakteri akan menyerap pewarna kontras safranin (Tortora dkk., 2020). Variasi ukuran dan pola susunan basil Gram-negatif yang teramati menunjukkan bahwa kelompok bakteri ini cukup beragam dan dapat berasal dari berbagai jenis mikroorganisme yang umum ditemukan pada infeksi saluran pernapasan bawah.

Keberadaan basil Gram-negatif dalam sputum sering dikaitkan dengan infeksi yang lebih kompleks, terutama pada pasien dengan kondisi komorbid, imunitas menurun, atau riwayat perawatan di fasilitas kesehatan. Secara morfologis, basil Gram-negatif dapat menunjukkan pola penyebaran tersebar, berantai pendek, maupun mengelompok di antara mukus dan sel inflamasi. Temuan ini sesuai dengan laporan sebelumnya yang menyebutkan bahwa bakteri Gram-negatif merupakan salah satu penyebab utama infeksi saluran pernapasan bawah, khususnya pada kasus pneumonia dan bronkitis berat (Ryan dkk., 2004; Sibanda dkk., 2020).

Selain karakter bakteri, pengamatan mikroskopis juga menunjukkan keberadaan mukus dan sel radang, seperti neutrofil, pada beberapa preparat. Temuan ini mengindikasikan bahwa sampel sputum yang dianalisis berasal dari saluran napas bawah

dan mencerminkan adanya proses infeksi yang sedang berlangsung. Kehadiran komponen inflamasi tersebut memperkuat validitas sampel sputum sebagai bahan pemeriksaan mikrobiologi, sebagaimana kriteria kualitas sputum yang baik (Tan dkk., 2020).

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pewarnaan Gram merupakan metode yang efektif untuk memberikan gambaran awal mengenai kelompok bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan. Informasi yang diperoleh dari pemeriksaan ini meliputi sifat Gram, bentuk sel, serta pola pengelompokan bakteri, yang semuanya berperan penting dalam interpretasi awal hasil diagnostik. Meskipun metode ini memiliki keterbatasan karena tidak mampu mengidentifikasi bakteri hingga tingkat spesies, pewarnaan Gram tetap memiliki nilai diagnostik yang tinggi sebagai langkah awal pemeriksaan, terutama di fasilitas kesehatan dengan keterbatasan sarana laboratorium lanjutan.

Dengan demikian, pewarnaan Gram dapat digunakan sebagai alat bantu yang cepat dan ekonomis dalam mendukung pengambilan keputusan klinis awal, khususnya dalam menentukan arah terapi antibiotik empiris. Hasil penelitian ini juga menegaskan bahwa pendekatan mikroskopis sederhana masih relevan dan memiliki peran penting dalam praktik mikrobiologi klinik serta penelitian deskriptif terkait infeksi saluran pernapasan.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada UPT RSUD Pandan, Kab. Tapanuli Tengah, khususnya kepada Kepala dan staff Laboratorium RSUD Pandan, atas izin fasilitas, dan bimbingan yang telah diberikan selama pelaksanaan kegiatan penelitian dan pengambilan data serta dukungan teknis dan juga kesempatan magang yang diberikan sangat membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Baron, E. J., Miller, J. M., Weinstein, M. P., Richter, S. S., Gilligan, P. H., Thomson, R. B., & Patel, R. (2013). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), e22–e121.
- Baron, E. J., Miller, J. M., & Thomson, R. B. (2022). *Manual of Clinical Microbiology* (13th ed.). ASM Press.
- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(3), 389–418.
- Handayani, D., Putri, D. H., & Oktaviani, M. (2021). Antimicrobial activity of endophytic fungi from Andalas (*Morus macroura* Miq.) plant. *Journal of Physics: Conference Series*, 1940(1), 012050. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1940/1/012050>
- Irdawati, D. F. A., Amanda, N. R., Putri, A., Pebryeni, S., Azhara, S., Efandri, V. C., Suherman, D., & Yeriska, F. (2023). Identifikasi dan karakterisasi isolat bakteri LFP di Laboratorium Fisika di Universitas Negeri Padang. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 3(1), 242–252. <https://doi.org/10.24036/prosemnasbio/vol3/572>
- Kumar, A., Arora, A., Sharma, P., & Meena, D. S. (2020). Role of Gram staining in rapid diagnosis of lower respiratory tract infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 14(4), DC01–DC05.

- Morrison, A. J., & Wenzel, R. P. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *The New England Journal of Medicine*, 310(13), 799–803.
- Peltola, V. T. (2000). Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* respiratory infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(Supplement_3), S521–S526.
- Mulia, M., Putri, D. H., Advinda, L., & Irdawati, I. (2023). Isolation of endophytic bacteria from taxus root (*Taxus sumatrana*) and test its potency as producer of antimicrobial compounds. *AL ULUM: Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1), 21–26. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1940/1/012050>
- Petti, C. A., Polage, C. R., & Schreckenberger, P. (2021). The role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis and management of infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(2), e02140-20.
- Ryu, B. H., Lee, J. Y., Kim, H. A., & Song, Y. G. (2022). Diagnostic performance of Gram stain microscopy for early detection of bacterial pneumonia in hospital settings. *BMC Pulmonary Medicine*, 22(1), 42.
- Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw-Hill.
- Sibanda, W., Chingombe, T., & Nhiwatiwa, T. (2020). Characterization of bacteria in sputum from patients with lower respiratory tract infections using Gram staining and culture. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 21(3), 264–271.
- Tan, H. L., Yeo, S. C., & Loh, J. Y. (2020). Assessing sputum sample quality in microbiological diagnosis. *Malaysian Journal of Pathology*, 42(1), 7–14.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2020). *Microbiology: An Introduction* (13th ed.). Pearson.
- Viona, A., Fevria, R., Irdawati, & Putri, D. H. (2024). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) pada fermentasi durian Montong (*Durio zibethinus* Murr.). *Masaliq: Jurnal Pendidikan dan Sains*, 4(1), 367–378. <https://doi.org/10.58578/masaliq.v4i1.2636>
- Wang, J., Lin, L., Wu, Y., & Zhang, Y. (2021). The role of Gram staining in initial screening of bacterial infections. *Journal of Infection and Public Health*, 14(5), 706–712.
- Zhou, H., Liu, Y., Zhang, W., & Wang, J. (2023). Importance of early bacterial identification in respiratory tract infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1052234.