

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada meja samping tempat tidur dan gagang pintu di bangsal kelas 3 Rumah Sakit X Surakarta. Sampel diambil menggunakan metode swab pada permukaan meja samping tempat tidur dan gagang pintu yang diduga menjadi tempat penumpukan bakteri penyebab infeksi nosokomial. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara menyeka permukaan benda uji secara aseptik menggunakan kapas lidi steril. Kapas lidi yang telah digunakan kemudian dicelupkan ke dalam media Brain Heart Infusion (BHI) dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan identifikasi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada nakas pasien dan gagang pintu kamar pasien dilakukan di Ruang Rawat Inap kelas III Rumah Sakit X Surakarta. Penelitian dilakukan pada Februari 2025 sampai Mei 2025

C. Populasi Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah nakas pasien dan gagang pintu kamar pasien yang berada di Ruang Rawat Inap kelas III di Rumah Sakit X Kota Surakarta, sementara itu sampel penelitian ini adalah masing-masing sebanyak 10 sampel nakas dan 10 sampel gagang pintu.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Berikut ini adalah alat yang digunakan dalam penelitian, diantaranya sebagai berikut :

- a. Laminar air flow atau entkas
- b. Tabung reaksi
- c. Objek gelas

- d. Mikroskop
- e. Tissue
- f. Kotak kontainer
- g. Ose lurus
- h. Ose bulat
- i. Rak pengecatan
- j. Pembakar spiritus
- k. Inkubator
- l. Cawan petri
- m. Korek api
- n. Kapas lidi steril
- o. Kapas
- p. APD lengkap (jas laboratorium, masker, handscoo)

2. Bahan

Bahan Berikut ini adalah bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya sebagai berikut:

- a. NaCl
- b. Reagen pewarnaan Gram
 - 1) Gram A (Kristal Violet)
 - 2) Gram B (JKJ → iodium, kalium, iodida)
 - 3) Gram C (Alkohol aseton)
 - 4) Gram D (Safranin)
- c. Reagen H₂O₂
- d. Plasma sitrat
- e. Media BHI (*Brain Heart Infusion*)
- f. Media MSA (*Manitol Salt Agar*)
- g. Media Agar
- h. Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)
- i. Media KIA (*Kligler's Iron Agar*)
- j. Media LIA (*Lysin Iron Agar*)
- k. Media SIM (*Sulfide, Indole, Motility*)
- l. Media Citrat
- m. Minyak imersi

E. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

- A. Hari ke I : Pengambilan sampel.
 - 1) Menyiapkan alat perlindungan diri seperti jas laboratorium, masker dan handscoo.

- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan dalam pengambilan sampel *Swab* nakas tempat makan dan gagang pintu kamar pasien secara aseptis.
- 3) Mengusapkan kapas lidi steril ke permukaan nakas tempat makan atau gagang pintu kamar pasien yang akan diperiksa (1 kapas lidi untuk 1 alat).
- 4) Menginokulasi ke media BHI (Brain Heart Infusion) dengan cara sebagai berikut :
 - a) Membawa segera BHI yang berisi sampel *Swab* alat ke laboratorium.
 - b) Menginkubasi media Brain Heart Infusion (BHI) tersebut selama 30 menit pada suhu 37°C di inkubator.
- 5) Mengisolasi pada media MSA selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator.

B. Hari ke II : Menginokulasi ke media Agar Miring

- 1) Mengamati koloni pada media MSA.
Ukuran : Kecil
Warna koloni : Kuning
Apabila koloni yang dihasilkan kecil dan jumlahnya sedikit, inkubasi dapat dilanjutkan kembali selama 24-48 jam di inkubator pada suhu 37°C.
- 2) Menginokulasi koloni yang didapatkan dari media MSA pada media Agar Miring selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator.

C. Hari ke III : Uji biokimia (uji katalase, uji koagulase), dan pewarnaan gram

- 1) Uji katalase
 - a) Mengambil koloni pada media Agar Miring menggunakan ose dan menempatkan pada objek glass.
 - b) Menambahkan H_2O_2 pada koloni tersebut.
 - c) Mengamati adanya gelembung gas.
Hasil : (+) Terjadi gelembung gas
- 2) Uji koagulase

- a) Mengambil koloni pada media Agar Miring menggunakan ose dan menempatkan pada objek glass.
- b) Meneteskan satu tetes plasma sitrat pada objek glass tersebut.
- c) Mencampur koloni bakteri dengan plasma sitrat secara merata.
- d) Menginkubasi selama 1-2 menit.
- e) Mengamati adanya gumpalan (aglutinasi),
Hasil : (+) Terjadi aglutinasi

- 3) Pewarnaan Gram
 - a) Mengambil 1-2 ose koloni pada media Agar, lalu diratakan pada objek glass steril, bersih dan bebas lemak. Preparat ditunggu hingga kering, kemudian memfiksasi diatas nyala api pembakar spirtus.
 - b) Meletakan preparat pada rak pengecatan, menggenangi preparat dengan Kristal Violet (Gram A) selama 1 menit, buang sisa cat.
 - c) Menggenangi preparat dengan larutan JKJ (Gram B), diamkan selama 30 detik, buang sisa larutan kemudian mencuci preparat dengan air mengalir.
 - d) Dekolorisasi preparat dengan alkohol 96 % (Gram C) sampai warna hilang dan bilas dengan air mengalir.
 - e) Menggenangi preparat dengan Safranin (Gram D), lalu diamkan selama 1-2 menit. Buang sisa cat dan cuci dengan air mengalir, kemudian preparat dikering anginkan.
 - f) Preparat yang sudah kering diamati menggunakan mikroskop dengan obyektif 100 kali dengan minyak imersi.
 - g) Mengamati secara mikroskopis.
Warna sel : Ungu
Bentuk : *Coccus* (bulat)
Susunan : Bergerombol

Sifat : Gram positif

2. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

A. Hari ke I : Pengambilan dan persiapan sampel.

- 1) Menyiapkan alat perlindungan diri seperti jas laboratorium, masker dan handscoon.
- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan dalam pengambilan sampel *Swab* nakas tempat makan dan gagang pintu kamar pasien secara aseptis.
- 3) Mengusapkan kapas lidi steril ke permukaan nakas tempat makan atau gagang pintu kamar pasien yang akan diperiksa (1 kapas lidi untuk 1 alat).
- 4) Menginokulasi ke media BHI (Brain Heart Infusion) dengan cara sebagai berikut :
 - a) Membawa segera BHI yang berisi sampel *Swab* alat ke laboratorium.
 - b) Menginkubasi media Brain Heart Infusion (BHI) tersebut selama 30 menit pada suhu 37°C di inkubator.
- 5) Mengisolasi kekeruhan pada media PSA (*Pseudomonas Selektif Agar*) selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator.

B. Hari ke II : Pengamatan koloni, uji biokimia (KIA, LIA, SIM, citrat), dan pewarnaan Gram.

- 1) Melakukan pengamatan koloni yang tumbuh pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) secara makroskopis.

Bentuk : Bulat

Ukuran : Kecil

Warna koloni : Hijau

Apabila koloni yang dihasilkan belum meyakinkan, kecil, dan jumlahnya sedikit, inkubasi dapat dilanjutkan kembali selama 24-48 jam di inkubator pada suhu 37°C.

- 2) Uji biokimia

Menginokulasikan 1 ose koloni yang tumbuh di media PSA pada media biokimia, yaitu:

a) KIA (*Kligler's Iron Agar*), dengan jalan menusuk dan menggores.

b) LIA (*Lysin Iron Agar*), dengan jalan menusuk dan menggores.

c) SIM (*Sulfide, Indole, Motility*), dengan jalan menusuk.

d) Citrat, dengan jalan menggores.

3) Pewarnaan Gram

a) Mengambil 1-2 ose koloni pada media Agar, lalu diratakan pada objek glass steril, bersih dan bebas lemak. Preparat ditunggu hingga kering, kemudian memfiksasi diatas nyala api pembakar spiritus.

b) Meletakan preparat pada rak pengecatan, menggenangi preparat dengan Kristal Violet (Gram A) selama 1 menit, buang sisa cat.

c) Menggenangi preparat dengan larutan JKK (Gram B), diamkan selama 30 detik, buang sisa larutan kemudian mencuci preparat dengan air mengalir.

d) Dekolorisasi preparat dengan alkohol 96 % (Gram C) sampai warna hilang dan bilas dengan air mengalir.

e) Menggenangi preparat dengan Safranin (Gram D), lalu diamkan selama 1-2 menit. Buang sisa cat dan cuci dengan air mengalir.

f) Preparat dikering anginkan.

g) Preparat yang sudah kering diamati menggunakan mikroskop dengan obyektif 100 kali dengan minyak imersi.

h) mengamati secara mikroskopis

Warna sel : Merah

Bentuk : Basil (batang)

Susunan : Menyebar

Sifat : Gram *negative*

C. Hari ke III : Pengamatan hasil uji biokimia

Mengamati hasil uji biokimia untuk mendeteksi adanya cemaran *Pseudomonas aeruginosa*, sebagai berikut:

KIA	: K/K S-
LIA	: K/K S-
SIM	: - - +
Citrat	: +

F. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dilakukan secara Total Sampling, yaitu dengan mengumpulkan *Swab* nakas pasien dan gagang pintu kamar pasien di Ruang Rawat Inap kelas III Rumah Sakit X Surakarta.

G. Teknik Analisis Data

Data yang didapat dari penelitian ini dianalisis kemudian dilakukan penarikan kesimpulan dari semua hasil yang diperoleh dari analisis di laboratorium. Jika hasil yang diperoleh menunjukkan hasil positif maka dapat disimpulkan terdapat cemaran bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Pseudomonas aeruginosa* pada sampel *Swab* nakas pasien dan gagang pintu kamar pasien di Ruang Rawat Inap kelas III Rumah Sakit X Surakarta