

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari udara ruang rawat inap di RSUP Surakarta yang diperoleh dari ruang bangsal Nakula 2 dan Sadewa 2 pada bulan April-Juni 2023.

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau diambil kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2 di RSUP Surakarta yang diambil sebanyak 30 titik sampel untuk 10 titik sampel pada ruang bangsal Nakula 2 (perawatan ibu dan anak) dan 20 titik sampel pada ruang bangsal Sadewa 2 (perawatan pasien dengan penyakit non infeksius) dengan pemilihan ruangnya secara sampling di pagi hari dan di sore hari.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang hidup pada media cawan papir di ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2 RSUP Surakarta.

Variabel utama kedua adalah antibiotik ciprofloxacin, gentamicin, imipenem dan ofloxacin.

Variabel utama ketiga adalah uji sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta terhadap antibiotik.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* hasil isolasi dari udara ruang rawat inap.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung untuk penelitian ini adalah zona hambat dari antibiotik terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap di RSUP Surakarta.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya sehingga hasil yang didapat bisa diulang dan tidak tersebar oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu antibiotik, laboratorium, peneliti, sterilisasi, media, peralatan, kemurnian bakteri, jumlah bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, udara adalah udara dari ruang bangsal Nakula 2 dan Sadewa 2 di RSUP Surakarta yang diambil pada pagi dan sore hari karena pengunjung masih diperbolehkan untuk berkunjung.

Kedua, ruang rawat inap adalah ruangan yang digunakan perawatan ibu dan anak (Nakula 2) dan perawatan pasien dengan penyakit non infeksius (Sadewa 2) untuk menjalani proses pengobatan secara intensif.

Ketiga, cawan papir adalah cawan petri yang berisikan media agar untuk mendeteksi adanya mikroorganisme yang menempel pada agar yang terekspos pada lingkungan.

Keempat, *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri gram negatif yang menyebabkan infeksi di ruang rawat inap RSUP Surakarta.

Kelima, isolasi merupakan metode yang menggunakan media PSA untuk memisahkan mikroorganisme dari mikroorganisme lainnya dengan menggunakan metode gores.

Keenam, antibiotik ciprofloxacin adalah antibiotik dari kelompok fluorokuinolon generasi kedua dengan cara kerja menghentikan pembentukan asam nukleat dan memiliki pola bakteri yang sensitif, *intermediate*, dan resisten.

Ketujuh, antibiotik gentamicin adalah antibiotik yang termasuk dalam golongan aminoglikosida dengan cara kerja menghentikan pembentukan protein dan memiliki pola bakteri yang sensitif, *intermediate*, dan resisten.

Kedelapan, antibiotik imipenem adalah antibiotik golongan karbapenem yang memiliki mekanisme kerja menghambat sintesis dinding sel bakteri dimana memiliki pola bakteri sensitif, *intemediet*, dan resisten.

Kesembilan, antibiotik ofloxacin adalah antibiotik yang termasuk dalam kelompok fluorokuinolon dengan cara kerja menghentikan pembentukan asam nukleat dan memiliki pola bakteri yang sensitif, *intermediet*, dan resisten.

Kesepuluh, uji sensitivitas, proses ini digunakan di RSUP Surakarta untuk mengevaluasi ketahanan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik yang diberikan kepada pasien yang terinfeksi.

Kesebelas, zona hambat pada media MHA, terdapat area bening di sekitar diskus yang tidak ditumbuhi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Keduabelas, sensitif adalah keadaan dimana antibiotik memberikan daya hambat yang baik terhadap mikroba bakteri.

Ketigabelas, *intermediet* adalah kondisi di mana tingkat sensitif beralih ke tingkat resisten tetapi tidak sepenuhnya resisten.

Keempatbelas, resistensi antibiotik adalah tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik atau mikroba bakteri sudah kebal terhadap antibiotik.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah jarum ose, lampu Bunsen, cawan petri steril, inkubator, tabung reaksi, inkas, autoklaf, pipet tetes, timbangan analitik, beaker glass, objek glass, mikroskop, pinset, kapas lidi steril, gelas ukur, penggaris, panci, dan pengaduk.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap di RSUP Surakarta, H₂O₂ 3%, aquadest, larutan standard *McFarland* 0,5, reagen untuk pengecatan Gram yaitu, Gram A (larutan kristal violet), Gram B (lugol iodine), Gram C (etanol 95%), Gram D (safranin), media PSA, media MHA, media BHI, minyak imersi, media KIA, media LIA, media SIM, dan media Citrat. Cakram antibiotik ciprofloxacin 5 µg, cakram antibiotik gentamicin 10 µg, cakram antibiotik imipenem 10 µg, cakram antibiotik ofloxacin 5 µg dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dari Laboratorium Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat yang berasal dari bahan kaca dilakukan dengan cara dicuci terlebih dahulu, lalu dikeringkan, kemudian bungkus menggunakan kertas koran dan ditutup menggunakan kapas lalu dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilisasikan dengan cara pemijaran api bunsen yang sebelumnya telah dicelupkan terlebih dahulu ke dalam alkohol 70% (Armaleni *et al.*, 2019).

2. Penyiapan media

Media PSA dipersiapkan terlebih dahulu yaitu dengan cara media ditimbang sesuai dengan yang akan digunakan kemudian dimasukkan kedalam panik dan dilarutkan dengan aquades. Larutan media dipanaskan hingga larut dan mendidih, serta tambahkan gliserin. Setelah itu, media dituang ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas, dan diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Selain itu, media dituang secara aseptis ke dalam cawan petri atau tabung reaksi steril setelah didiamkan hingga suhu mencapai suam-suam kuku (50°C).

3. Uji cawan papir

Uji cawan papir merupakan cawan petri yang telah berisikan media yang kemudian dipaparkan dalam ruang untuk menangkap bakteri yang ada di udara dalam kurun waktu kurang dari 4 jam. Kemudian cawan papir diinkubasi pada suhu 30°C – 35°C dalam keadaan terbalik selama 48 jam (BPOM, 2018). Cawan papir memiliki keunggulan memungkinkan titik pengambilan sampel terletak dekat dengan produk yang terpapar dan memungkinkan permukaan cawan petri terus terpapar selama empat jam tanpa mempengaruhi lingkungan sekitarnya. Cawan papir selama 4 jam memiliki kelemahan yaitu rentan terhadap penanganan, pengangkutan, dan pencemaran lingkungan (Atisha dan Musfiroh, 2020).

4. Isolasi bakteri

Sampel udara yang diambil secara acak dari udara ruang rawat inap bangsal ibu dan anak dan ruang bangsal non infeksius di RSUP Surakarta pada bulan April-Juni 2023. Sampel diambil pada ruang bangsal Nakula 2 dan Sadewa 2 dengan jumlah 30 titik sampel serta 3x replikasi. Pengambilan sampel menggunakan 10 cawan petri untuk ruang bangsal Nakula 2 dan 20 cawan petri untuk bangsal Sadewa 2 dengan

masing-masing pengambilan pagi hari dan sore hari yang dilakukan dengan cara meletakkan cawan petri yang sudah berisikan media PSA dalam keadaan terbuka diruangan dan didiamkan selama 15 menit. Setelah 15 menit, tutup cawan petri dan bungkus dengan kertas koran, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *cool box* untuk dibawa ke laboratorium. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator (Hayati dan Puspita, 2012). Koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri dilakukan identifikasi bakteri menggunakan morfologi koloni, mikroskopis, dan uji biokimia.

5. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

5.1. Morfologi Koloni pada medium diferensial. Pemeriksaan koloni pada media PSA mengungkapkan ciri-ciri yang mengindikasikan adanya *Pseudomonas aeruginosa*, yaitu bakteri yang diinkubasi yang telah diisolasi melalui udara di bangsal Nakula 2 dan Sadewa 2. Koloni-koloni ini menunjukkan penampilan yang halus, bulat dan fluoresensi kehijauan karena adanya pigmen *pyoverdin*. Adanya magnesium klorida dan kalium sulfat di PSA menyebabkan pembentukan pigmen *pyoverdin* (Purwaningsih dan Wulandari, 2020).

5.2. Mikroskopis. Isolat yang diperoleh diidentifikasi dengan metode mikroskopis. Metode mikroskopis diselesaikan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui kemurnian sel bakteri dan mengamati morfologi sel *Pseudomonas aeruginosa*. Dilakukan melalui keadaan bakteri yang telah diatur dengan cara ditetaskan dengan larutan kristal violet (Gram A), dibiarkan selama 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditetaskan, kemudian ditetaskan dengan larutan Iodine (Gram B) lalu didiamkan selama 60 detik dan dicuci dengan air mengalir kemudian ditiriskan. Setelah itu preparat ditetesi larutan etanol 95% (Gram C) selama 15 sampai 30 detik, dibilas dengan air mengalir, ditiriskan, ditetesi safranin (Gram D) selama 60 detik, dibilas, lalu dikeringkan. Setelah itu, minyak imersi dan mikroskop pembesar 1000x digunakan untuk memeriksa preparat (Sulviana *et al.*, 2017).

5.3. Uji biokimia. Hasil pertumbuhan pada media PSA diambil 1 koloni, lalu diuji pada media KIA, SIM, LIA, Citrat yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada uji katalase hasil pertumbuhan koloni bakteri pada media PSA diambil 1 koloni, letakkan pada objek glass kemudian tetesi dengan H₂O₂ 3%, kemudian diamati.

Uji pada media KIA, jika *Pseudomonas aeruginosa* berwarna merah pada lereng dan dasar media tetapi tidak membentuk warna hitam (K/K^{S-}) maka hasilnya positif. Karena bakteri tersebut tidak dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, *Pseudomonas aeruginosa* tidak menghasilkan asam dan tidak menghasilkan warna hitam (H₂S negatif).

Uji pada media SIM, jika sulfida, indol negatif, dan motilitas positif. Hasil pembentukan warna tidak hitam (H₂S negatif) negatif, maka hasil menunjukkan *Pseudomonas aeruginosa* positif. Setelah penambahan reagen Erlich A dan B (1:1), uji indol menunjukkan negatif atau tidak ada cincin merah. Hal ini dikarenakan bakteri tersebut tidak menghasilkan indol dan triptofan sebagai sumber karbon.

Uji pada media LIA, jika terbentuk warna ungu pada lereng dan dasar media tetapi tidak terbentuk warna hitam (K/K^{S-}), maka hasil menunjukkan adanya *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan hasil tersebut bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk sulfida (warna hitam), dan tidak membentuk deaminasi lisin sehingga dapat membentuk dekarboksilasi lisin (warna ungu).

Uji pada media Citrat, jika media menjadi biru, hasil menunjukkan adanya *Pseudomonas aeruginosa*. Adanya amoniak turunan monoamonium fosfat dalam media mengakibatkan peningkatan pH media di atas 7,6 (Sulviana *et al.*, 2017).

Reagen Hidrogen Peroksida (H₂O₂) digunakan untuk uji katalase. Dengan menggunakan jarum ose, koloni diambil, ditempelkan pada objek gelas, kemudian ditetesi dengan H₂O₂ untuk pengujian ini. Setelah itu diamati hasilnya untuk mengetahui ada atau tidaknya gelembung gas. Jika ada gelembung gas, ini menunjukkan hasil yang positif, apabila tidak ada gelembung gas menunjukkan hasil yang negatif (Juniawan *et al.*, 2023).

6. Pembuatan suspensi bakteri

Satu koloni bakteri yang diinokulasikan pada media cair BHI digunakan untuk mengambil isolat bakteri dari media PSA yang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian, bandingkan kekeruhan media BHI dengan standar *McFarland* sebesar 0,5 atau 1,5x10⁸ cfu/ml (Sulviana *et al.*, 2017).

7. Cara uji sensitivitas

Difusi cakram *Kirby Bauer* digunakan untuk pengujian sensitivitas. Untuk memulai, media MHA yang telah disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Kedua,

suspensi *Pseudomonas aeruginosa* pada media BHI dioleskan pada media MHA dengan kapas steril dan didiamkan selama sepuluh menit pada suhu ruang. Cakram berisi antibiotik ciprofloxacin 5 µg, gentamicin 10 µg, imipenem 10 µg, ofloxacin 5 µg diletakkan pada media MHA yang telah ditanami mikroba dengan jarak yang sama, kemudian pada saat itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, ukur zona hambat yang berpusat pada cakram. Interpretasi hasil mengacu pada CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) dan digolongkan menjadi sensitif, intemediet, dan resistensi.

E. Analisis Data

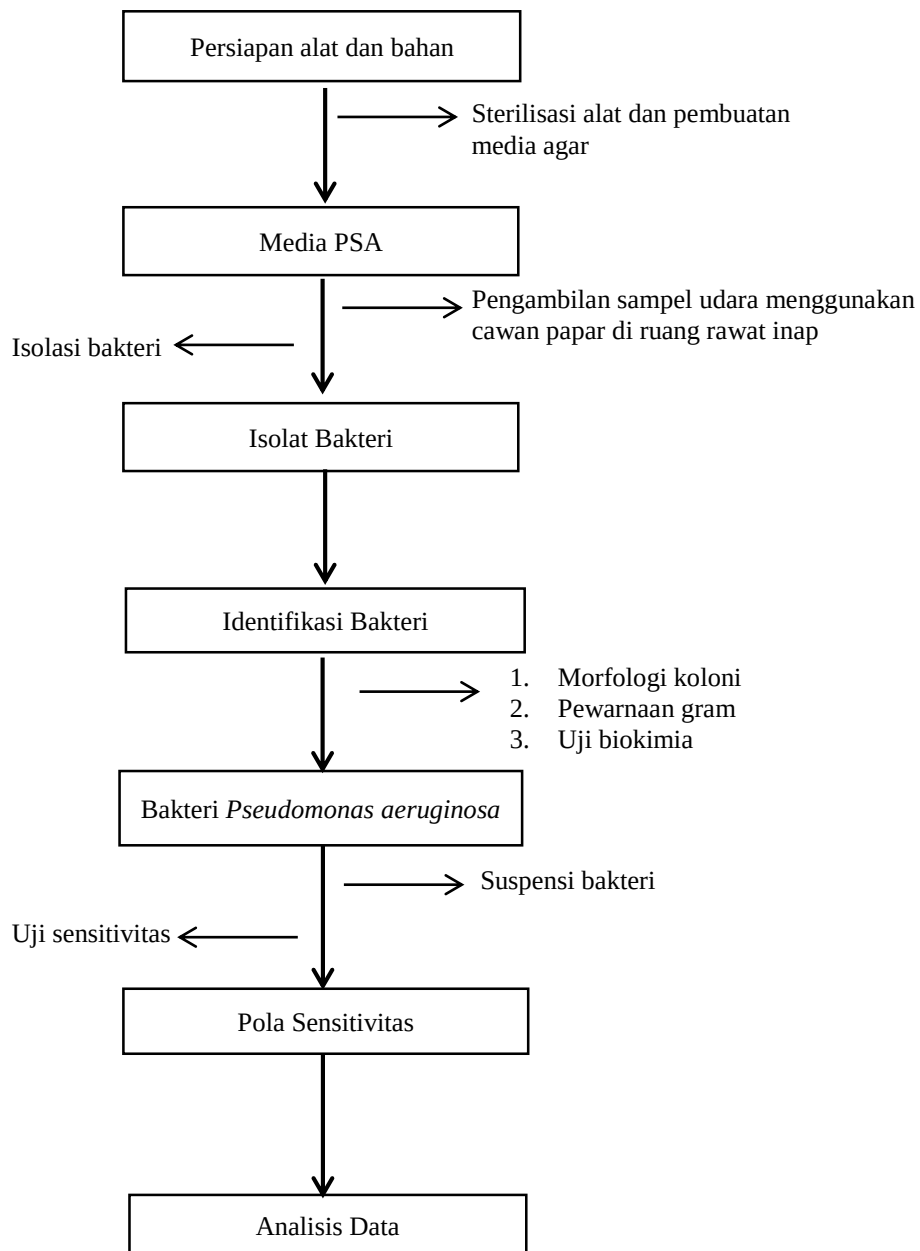
Peneliti mendapatkan hasil berupa zona hambat dari masing-masing antibiotik ciprofloxacin, gentamicin, imipenem dan ofloxacin yang kemudian diolah secara deskriptif untuk mengetahui pola bakteri dan sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta bulan April-Juni 2023 serta dilakukan analisis dengan replikasi 3x. Analisa data dilakukan secara statistik dengan standar deviasi untuk membandingkan hasil zona hambat *Pseudomonas aeruginosa* dari udara ruang rawat inap dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berdasarkan Tabel 1. Zona Diameter Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabel 1. Zona Diameter Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotik	Disk content (µg)	Zona diameter (mm)		
		Sensitif	Intermediate	Resisten
Ciprofloxacin	5 µg	≥25	19-24	≤18
Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12
Imipenem	10 µg	≥19	16-18	≤15
Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12

Sumber : *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2020

F. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema Penelitian