

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif dengan tujuan menentukan keberadaan kontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada instrumen di Unit Gawat Darurat (UGD) RSUD "X", Surakarta. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode usap pada instrumen yang diduga terkontaminasi bakteri. Prosedur usap meliputi pembersihan permukaan instrumen bedah minor secara aseptik menggunakan kapas lidi steril. Sampel kapas lidi kemudian ditempatkan dalam media BHI dan dibawa ke laboratorium untuk pemeriksaan lebih lanjut.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juni 2025.

2. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di Ruang IGD Rumah Sakit "X" Surakarta dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Universitas Setia Budi.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek yang akan diteliti atau objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah semua alat yang sering digunakan di ruang IGD Rumah Sakit "X" Surakarta.

2. Sampel Penelitian

a. Besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditetapkan sebanyak 10 instrumen, yang diambil dari keseluruhan populasi alat kesehatan di Instalasi Gawat Darurat (IGD) Rumah Sakit "X" Surakarta. Sampel tersebut meliputi instrumen seperti pinset, gunting, klem, *syringe pump*, dan *infusion pump*.

b. Teknik sampling

Pengambilan sampel (*sampling*) didefinisikan sebagai proses memilih elemen-elemen dari suatu populasi sehingga sifat atau karakteristik dari sampel tersebut dapat

digeneralisasikan pada populasi (Noor, 2015). Metode yang digunakan dalam proses ini dikenal dengan istilah teknik pengambilan sampel (Sugiyono, 2015). Pada penelitian ini, metode yang digunakan adalah *purposive sampling*, di mana sampel dipilih dari populasi alat kesehatan di Instalasi Gawat Darurat (IGD) Rumah Sakit "X" Surakarta berdasarkan pertimbangan atau kriteria tertentu.

Dengan mempertimbangkan alat kesehatan yang paling sering digunakan di Instalasi Gawat Darurat, dipilih 10 instrumen sebagai sampel penelitian, dengan klasifikasi sebagai berikut:

- a. 5 jenis alat di ruang IGD, meliputi pinset, gunting, klem, syringe pump, dan infus pump, berada dalam kondisi telah digunakan namun belum melalui proses pembersihan dan sterilisasi.
- b. 5 jenis alat di ruang IGD, meliputi pinset, gunting, klem, syringe pump, dan infus pump, yang telah melalui proses sterilisasi dan selanjutnya disusun dalam set alat bedah minor.

D. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel 1	Definisi Operasional 2	Cara Pengukuran 3	Skala 4
Alat-alat di ruang IGD	Alat-alat dalam penelitian ini yaitu pinset, gunting, klem, syringe pump, dan infus pump	Observasional	Nominal
Identifikasi Bakteri Patogen	Menentukan jenis bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit, yang diidentifikasi dari swab alat di ruang Instalasi Gawat Darurat (IGD). Bakteri patogen gram positif dalam penelitian ini adalah <i>Staphylococcus aureus</i> , Sementara bakteri patogen gram negatif dalam penelitian ini adalah <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Pemeriksaan secara mikroskopis dan uji biokimia, serta pewarnaan Gram.	Nominal

E. Variabel Penelitian

Variabel penelitian dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah alat-alat di Ruang IGD Rumah Sakit “X” Surakarta yaitu pinset, gunting, klem, sringe pump, dan infus pump yang berjumlah 10 sampel alat untuk dijadikan sebagai sampel penelitian.

2. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ada atau tidaknya cemaran bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada sampel swab alat-alat di IGD Rumah Sakit “X” Surakarta.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

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

- a. APD lengkap (jas laboratorium, masker, handscoon)
- b. *Laminar air flow* atau *entkas*
- c. Tabung reaksi
- d. Objek gelas
- e. Mikroskop Olympus CX23
- f. Tissue
- g. Kotak kontainer
- h. Ose lurus
- i. Ose bulat
- j. Rak pengecatan
- k. Pembakar spiritus
- l. Inkubator
- m. Cawan petri
- n. Kapas lidi steril

2. Bahan

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

- a. NaCl
- b. Cat Gram
 - 1) Gram A
 - 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 Agar Miring
- g. Media VJA (*Vogel-Johnson Agar*)
- h. Media KIA (*Kligler's Iron Agar*)
- i. Media LIA (*Lysin Iron Agar*)
- j. Media SIM (*Sulfide, Indole, Motility*)
- k. Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)
- l. Minyak imersi

G. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

- a. Hari ke I : Pengambilan dan persiapan sampel.
 - 1) Alat dan bahan yang digunakan dalam pengambilan sampel swab alat-alat bedah minor di ruang IGD disiapkan.
 - 2) Kapas lidi steril diusapkan ke permukaan alat-alat bedah minor yang akan diperiksa (1 kapas lidi untuk 1 alat).
 - 3) Hasil usapan dari satu alat diinokulasikan ke dalam satu media penyubur BHI.
 - 4) Media BHI diinkubasi selama sekitar 30 menit pada suhu 37°C di dalam inkubator.
 - 5) Suspensi bakteri yang tumbuh diisolasi pada media VJA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.
- b. Hari ke II : Menginokulasi ke media Agar Miring
 - 1) Koloni pada media VJA diamati.
 - 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) Koloni yang didapatkan dari media VJA diinokulasikan pada media agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.

c. Hari ke III : Uji biokimia (uji katalase, uji koagulase)

1) Uji katalase

- a) Koloni pada media agar miring diambil menggunakan ose dan ditempatkan diobjek glass
 - b) H_2O_2 ditambahkan pada koloni tersebut.
 - c) Adanya gelembung gas diamati
- Hasil: (+) Terjadi gelembung gas.

2) Uji koagulase

- a) Koloni pada media agar miring diambil menggunakan ose dan ditempatkan pada objek glass.
 - b) Satu tetes plasma sitrat diteteskan pada koloni tersebut.
 - c) Koloni bakteri dicampurkan secara merata dengan plasma sitrat.
 - d) Campuran tersebut diinkubasi selama sekitar 4 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C .
 - e) Adanya gumpalan (aglutinasi) diamati.
- Hasil: (+) Terjadi aglutinasi.

3) Pewarnaan Gram

- a) Proses diawali dengan pengambilan 1–2 ose koloni bakteri dari media agar miring. Koloni tersebut kemudian disuspensikan dan diratakan di atas kaca objek yang telah steril, bersih, dan bebas lemak. Preparat dibiarkan mengering di udara, lalu difiksasi dengan cara melewatkannya beberapa kali di atas nyala api dari pembakar spiritus.
- b) Setelah fiksasi, preparat ditempatkan di atas rak pewarnaan dan ditetesi larutan Kristal Violet (Gram A) hingga seluruh permukaan tergenang. Diamkan selama 5 menit, lalu sisa pewarna dibuang.
- c) Selanjutnya, larutan JKJ (Gram B) diteteskan hingga menggenangi preparat dan dibiarkan selama 30 detik. Sisa larutan kemudian dibuang, dan preparat dibilas menggunakan air mengalir.
- d) Tahap dekolorisasi dilakukan dengan meneteskan alkohol 96% (Gram C) pada preparat sampai warna ungu luntur. Segera setelah itu, preparat dibilas

kembali dengan air mengalir untuk menghentikan proses dekolorisasi.

- e) Sebagai pewarna tandingan, larutan Safranin (Gram D) ditetaskan hingga menutupi preparat dan didiamkan selama 1 hingga 2 menit. Sisa pewarna lalu dibuang, preparat dibilas dengan air mengalir, dan terakhir dibiarkan kering di udara (dikeringanginkan).
- f) Setelah preparat benar-benar kering, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop. Minyak imersi ditetaskan pada preparat, dan pengamatan dilakukan menggunakan lensa objektif dengan perbesaran 1000x.
- g) Pengamatan secara mikroskopis dilakukan.
 Warna sel : Ungu
 Bentuk : Coccus (bulat)
 Susunan : Bergerombol
 Sifat : Gram positif

2. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

- a. Hari 1: Pengambilan sampel
 - 1) Alat dan bahan yang digunakan dalam pengambilan sampel swab alat-alat bedah minor di ruang IGD disiapkan.
 - 2) Kapas lidi steril diusapkan ke permukaan alat-alat bedah minor yang akan diperiksa (1 kapas lidi untuk 1 alat).
 - 3) Hasil usapan dari satu alat diinokulasikan ke dalam satu media penyubur BHI.
 - 4) Media BHI diinkubasi selama sekitar 30 menit pada suhu 37°C di dalam inkubator.
 - 5) Suspensi bakteri yang tumbuh diisolasi pada media PSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.
- b. Hari II: Pengamatan koloni, uji biokimia (KIA, LIA, SIM, citrat), dan pewarnaan Gram.
 - 1) Pengamatan koloni pada media PSA 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

Sebanyak 1 ose koloni yang tumbuh di media PSA diinokulasikan ke dalam media biokimia berikut:

- a) KIA (*Kligler's Iron Agar*), diinokulasikan dengan cara ditusuk dan digores.
- b) LIA (*Lysin Iron Agar*), diinokulasikan dengan cara ditusuk dan digores.
- c) SIM (*Sulfide, Indole, Motility*), diinokulasikan dengan cara ditusuk.
- d) Citrat, diinokulasikan dengan cara ditusuk.

Seluruh media biokimia tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.

3) Pewarnaan Gram

- a) Pertama, dibuat apusan bakteri dengan mengambil 1–2 ose koloni dari media agar miring dan meratakannya pada kaca objek yang steril, bersih, serta bebas lemak. Apusan tersebut kemudian dibiarkan kering di udara, lalu dilekatkan (fiksasi) dengan cara melewatkannya di atas nyala api pembakar spiritus.
- b) Preparat yang telah difiksasi kemudian ditempatkan di atas rak pewarnaan. Selanjutnya, seluruh permukaan preparat ditutupi dengan larutan Kristal Violet (Gram A) dan dibiarkan selama 5 menit sebelum sisa pewarna dibuang.
- c) Setelah itu, preparat ditetesi dengan larutan JKJ (Gram B) hingga tergenang dan didiamkan selama 30 detik. Sisa larutan lalu dibuang dan preparat dibilas bersih menggunakan air mengalir.
- d) Tahap selanjutnya adalah dekolorisasi (pelunturan warna) menggunakan alkohol 96% (Gram C) yang ditetaskan pada preparat hingga warnanya luntur.

Proses ini segera dihentikan dengan membilas preparat menggunakan air mengalir.

- e) Sebagai pewarna penutup, preparat digenangi dengan larutan Safranin (Gram D) selama 1 hingga 2 menit. Kemudian, sisa pewarna dibuang, preparat dibilas dengan air mengalir, dan terakhir dibiarkan kering di udara.
- f) Untuk pengamatan, preparat yang sudah kering diletakkan di atas meja mikroskop. Satu tetes minyak imersi diberikan di atas preparat, lalu diamati menggunakan lensa objektif perbesaran 1000x.
- g) Langkah terakhir adalah melakukan pengamatan preparat di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi karakteristik bakteri.

Warna sel	:Merah
Bentuk	:Basil (batang)
Susunan	:Menyebar
Sifat	:Gram negatif
- c. Hari ke IV : Pengamatan hasil uji biokimia
 Hasil uji biokimia diamati untuk mendeteksi adanya cemaran *Pseudomonas aeruginosa*, sebagai berikut:
 KIA : K/K S-
 LIA : K/K S-
 SIM : - - +
 Citrat : +

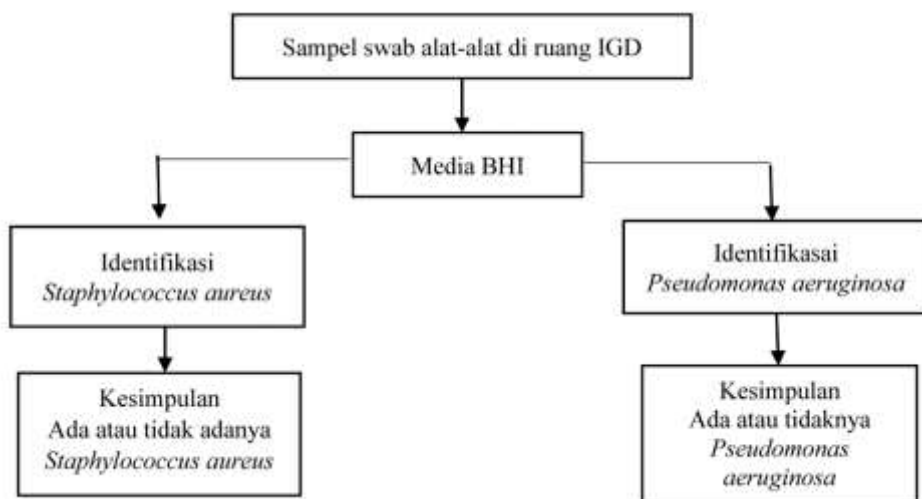
H. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara observasi alat-alat yang digunakan di ruang IGD Rumah Sakit “X” Surakarta, kemudian dilakukan swab alat dan melakukan pemeriksaan laboratorium untuk mengidentifikasi bakteri.

I. Teknik Analisis Data

Proses analisis dilakukan terhadap semua data yang dihasilkan dari penelitian di laboratorium, yang kemudian menjadi dasar untuk penarikan kesimpulan. Kesimpulan yang dapat diambil adalah, jika hasil yang didapat positif, maka itu berarti sampel usap (swab) dari peralatan di Ruang IGD Rumah Sakit “X” Surakarta terbukti telah tercemar oleh bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian