

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional dengan pendekatan *cross sectional* yaitu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui jumlah kuman serta identifikasi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada ruang rawat inap RSJD Surakarta.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – April 2019. Tempat penelitian yang digunakan yaitu di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan Laboratorium terpadu Universitas Sebelas Maret.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah ruang rawat inap Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta yang terdiri dari ruang rawat inap kelas VIP, dan Kelas III.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah *swab* lantai ruang rawat inap VIP dan Kelas III Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta yang terdiri 3 Kamar VIP, 2 bangsal Kelas III. Sampel yang diidentifikasi adalah sarana yang berada di

ruang VIP dan Kelas III seperti ranjang pasien, meja pasien, kursi pengunjung dan pegangan pintu ruang rawat inap di Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah ALT dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dapat didefinisikan ke dalam berbagai macam variable, yaitu variable bebas dan variabel terikat.

a. Variabel Bebas

Variabel bebas untuk penelitian ini adalah ruang rawat inap Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta yang terdiri dari ruang rawat inap kelas VIP dan Kelas III.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah kuman dan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

a. Angka Lempeng total adalah uji yang digunakan untuk menghitung jumlah total angka kuman pada sampel tertentu. Angka kuman pada lantai

merupakan jumlah kuman yang di dapatkan pada apusan lantai dihitung berdasarkan jumlah koloni menggunakan satuan CFU/cm²

- b. Identifikasi adalah uji bakteri yang digunakan untuk mengetahui bakteri yang terdapat pada sampel tertentu termasuk bakteri patogen atau tidak.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah: Cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur, pussball, vortex, lampu spirtus, kaki tiga, kapas lidi steril, incubator, objek glas, jarum ose, mikroskop, autoclave, nampan, *becker glas*, *hot plate*, *coloni counter*, *magnetic stirrer*, *neraca analitik*, *laminair air flow*, alat pelindung diri lengkap.

2. Bahan

a. Media

Media yang digunakan adalah media (PCA) *Plate count agar*, *Manitol Salt Agar* (MSA), dan (PSA) *Pseudomonas selektif agar*. *Medium Kligler Iron Agar* (KIA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Simmons Citrat Agar* (Citrat).

b. Larutan

Bahan larutan yang digunakan yaitu cat Gram A (*Kristal violet*), Gram B (*Lugol Iodine*), Gram C (Alkohol), Gram D (*Safranin*), Spirtus,

Etanol 95%, aquades, NaCl fisiologis (NaCl 0,9%), H₂O₂ 3%, *Emersi oil*,
Xylol.

F. Prosedur Penelitian

1. Uji Pendahuluan

Tahap pertama penelitian ini adalah uji pendahuluan ke ruang rawat inap Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta dengan tujuan untuk mendapatkan informasi tentang ruang rawat inap dan survei lokasi yang akan di swab untuk uji penentuan angka lempeng total dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Pembuatan Media PCA (*Plate Count Agar*)

Alat dan bahan disiapkan bubuk media *Plate Count Agar* ditimbang sebanyak 15,525 gram lalu dimasukkan ke dalam erlenmayer 1000 ml dilarutkan dengan 690 ml aquadest pH \pm 7 (netral) ditambahkan *magnetic stirrer* lalu dihomogenkan dengan cara dipanaskan menggunakan *hot plate*. Erlenmayer yang berisi media ditutup dengan kapas yang dilapisi *aluminium foil* diikat dengan benang. Media kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu media didinginkan mencapai suhu 45-50°C kemudian media dituang ke dalam petri dan dapat digunakan.

3. Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

Ditimbang bubuk media MSA sebanyak 37,26 gram dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 345 ml kemudian homogenkan. *Magnetic stirrer* di masukan ke dalam erlenmayer dan panaskan di atas *hot plate* sampai mendidih. Setelah itu tutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Sterilkan media menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Tuang media ke dalam cawan petri kurang lebih 15-20 ml dan biarkan media memadat setelah memadat media siap digunakan.

4. Pembuatan Media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA)

bubuk media *Pseudomonas Selective Agar* di timbang sebanyak 19,7005 gram dimasukan ke dalam erlenmayer kemudian menambahkan aquadest sebanyak 465 ml lalu dimasukan *magnetic stirrer* kemudian dipanaskan sampai larut diatas *hot plate* lalu ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Media yang sudah larut kemudian di *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Tuang media ke dalam cawan petri kurang lebih 15-20 ml dan biarkan memadat setelah memadat media siap digunakan.

5. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara usapkan *cotton swab* steril pada lantai dan sarana yang sebelumnya telah dicelupkan kedalam larutan ringer steril. Setelah itu di masukan *cotton swab* tersebut ke dalam ringer. Sampel dari usap dinding tadi diberi kode pengambilan lalu dimasukan kedalam *ice box* dan dibawa ke laboratorium.

6. Prosedur Penentuan Angka Lempeng Total

Sampel berupa cairan diencerkan dengan larutan NaCl Fisiologis. Pengenceran dilakukan sebanyak 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Berikut adalah cara pengencerannya:

Sampel dipipet secara aseptik sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi 10^0 , Sampel dipipet lagi 1 ml dimasukkan tabung reaksi 10^{-1} yang berisi 9 ml larutan akuades steril, kemudian dihomogenkan kemudian lakukan pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-3} .

Uji angka lempeng total yaitu dari setiap pengenceran dipipet 1 ml suspensi ke dalam cawan petri steril secara duplo. Cawan petri masing-masing dituangkan sebanyak 15 ml media PCA. Cawan petri digoyang dengan hati-hati supaya sampel tersebar rata. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 - 48 jam. Kemudian jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

Uji kontrol dilakukan untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitasnya dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam cawan petri dan biarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dan 1 ml pengencer akuades steril lalu dibiarkan memadat.

7. Perhitungan Jumlah Kuman (CFU/Cm²)

Jumlah kuman (CFU/cm²) swab lantai

$$X \text{ kol} = \frac{(a-d).10^0 + (b-d).10^1}{2}$$

$$JK = \frac{V \times X}{L}$$

Keterangan :

JK : Jumlah Kuman

X kol : Rata-rata jumlah koloni / ml

V : Volume buffer phosphate dalam botol steril (ml)

L : Luas permukaan usap (cm²)

a : Jumlah koloni pengenceran 10⁰

b : Jumlah koloni pengenceran 10¹

d : Jumlah koloni dalam control

(Oktarini, 2013)

8. Cara Identifikasi *Staphylococcus aureus*

a. Pengecatan Gram

Dibersihkan gelas benda kaca objek dengan alkohol dan buat preparat smear secara aseptis dan keringkan udara. Lakukan fiksasi diatas api spiritus letakan preparat smear di rak pengecatan. Ditetesi 2-3 tetes cat utama (Gram A) dan diamkan 1 menit, cuci dengan air mengalir dan tiriskan. Tetsi dengan larutan (Gram B) dan diamkan 1 menit cuci dengan air mengalir dan tiriskan. Ditetesi dengan (Gram C) dan biarkan 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Ditetesi dengan cat penutup (Gram D) dan diamkan 1 menit. Keringkan preparat diudara dan amati dibawah mikroskop dengan perbesaran kuat.

b. Uji Katalase

Tetaskan 1 tetes larutan H₂O₂ 3% diatas kaca objek yang bersih ditambahkan satu ose koloni bakteri dari media MSA kemudian homogenkan. Amati adanya gelembung gas yang menunjukkan hasil positif.

c. Uji Koagulase

Uji tabung untuk mengetahui koagulase bebas, ditambahkan 200µl plasma dimasukan ke dalam tabung ditambahkan 3-4 koloni biakan *Staphylococcus*. Kemudian dicampur hati-hati selanjutnya di masukan inkubator pada suhu 37°C. Dilakukan pengamatan pada 4 jam

pertama dan setelah 18-24 jam. Reaksi positif jika terbentuk clot atau jelly tetap di dasar tabung (Lay, 1994).

9. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

a. Pengecatan Gram

Bersihkan kaca objek dengan alkohol dan fiksasi diatas api spiritus. Membuat preparat smear dari bakteri yang tumbuh pada PSA. letakan preparat smear di rak pengecatan. Ditetesi 2-3 tetes cat utama (Gram A) dan diamkan 1 menit, cuci dengan air mengalir dan tiriskan. Tetesi dengan larutan (Gram B) dan diamkan 1 menit cuci dengan air mengalir dan tiriskan. Ditetesi dengan (Gram C) dan biarkan 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan cat penutup (Gram D) dan diamkan 1 menit. Keringkan preparat diudara dan amati dibawah mikroskop dengan perbesaran kuat.

b. Uji Biokimia

Ambil Koloni dari media PSA dan inokulasikan kedalam media KIA dan LIA dengan cara menusukan bagian dasar media lalu digoreskan dibagian lereng secara aseptis. Selanjutnya koloni tanam pada media SIM dengan cara mensukan sampai kedasar Media secara Aseptis kemudian tanam pada media Citrat dengan cara menggores dibagian lereng. Inkubasi media pada suhu 37°C selama 24 Jam dan amati hasilnya.

G. Teknik Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari Penentuan total angka kuman dan identifikasi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperiksa di Laboratorium terpadu Universitas Sebelas Maret dan Laboratorium Bakteriologi Universitas Setia Budi Surakarta dengan metode *swab*. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *Purposive Sampling*. Hasil dianalisis dengan menggunakan diagram batang.

H. Teknik Analisis Data

Data yang di peroleh diolah melalui proses editing data, koding data dan tabulasi data. Kemudian data yang diperoleh dianalisis dan dibuat diagram batang.