

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari udara ruang rawat inap pada infeksi nosokomial di RSUP Surakarta yang diperoleh dari ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2 pada bulan April-Juni 2023.

#### **2. Sampel**

Sampel adalah bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan aturan tertentu, sehingga memenuhi kebutuhan yang tidak teratur dan berlebihan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang terdapat di udara ruang rawat inap pasien RSUP Surakarta dan diambil sebanyak 30 sampel dipagi dan disore hari secara sampling dalam pemilihan ruangan.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah pertama bakteri *Staphylococcus aureus* yang hidup pada media cawan papar di ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2 di RSUP Surakarta.

Variabel utama kedua adalah antibiotik yang digunakan di RSUP Surakarta untuk pengobatan pasien infeksi antara lain: azitromisin, ciprofloksasin, doksisisiklin, eritromisin, dan gentamisin.

Variabel ketiga adalah uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta terhadap antibiotik.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variable yaitu variable bebas, variable kendali, dan variable tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* hasil isolasi dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga penting untuk menentukan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dan tidak disebarkan oleh peneliti yang berbeda secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian

ini adalah laboratorium, peneliti, sterilisasi, media, peralatan, kemurnian bakteri, jumlah bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari antibiotik yang digunakan terhadap *Staphylococcus aureus* dari udara ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2 RSUP Surakarta pada bulan April-Juni 2023.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, sampel *Staphylococcus aureus* ruang rawat inap Nakula 2 dan sadewa 2 RSUP Surakarta bulan April-Juni 2023. Pengambilan udara dilakukan pada pagi hari dan sore hari karena pengunjung masih banyak yang berkunjung.

Kedua, ruang rawat inap yang digunakan untuk penelitian yaitu ruang rawat inap Nakula 2 dan Sadewa 2. Ruangan Nakula 2 merupakan ruangan perawatan ibu dan anak. Sadewa 2 merupakan ruangan non infeksius.

Ketiga, cawan papar merupakan salah satu teknik yang digunakan sebagai alat untuk pemantauan ruangan bersih. Metode cawan papar merupakan cawan petri yang berisi media agar nutrisi yang terekspos pada lingkungan, karena hanya beberapa mikroorganisme yang dapat mengendap dipermukaan agar yang terdeteksi, maka metode ini dapat digunakan sebagai pengujian secara kualitatif, semi kuantitatif, dan pemantauan udara. Uji cawan papar dilakukan selama 15 menit. (FDA, 2004).

Keempat, *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif yang menjadipenyebab infeksi di ruang rawat inap RSUP Surakarta.

Kelima, isolasi adalah suatu metode untuk melepaskan mikroorganisme terhadap mikroorganisme lain dengan menggunakan metode gores yang dilakukan pada media *Vogel Jhonson Agar* (VJA).

Keenam, antibiotik azitromisin adalah antibiotik dengan spektrum sedang yang bersifat bakteriostatik, yang berarti menghentikan pertumbuhan kuman. Antibiotik ini bekerja dengan cara menghambat sintesis protein kuman dengan jalan berikatan secara reversibel dengan ribosom subunit 50.

Ketujuh, antibiotik doksisisiklin merupakan salah satu jenis antibiotik dengan sifat penghambat MMP.

Kedelapan, antibiotik eritromisin merupakan antibiotik

golongan makrolida. Eritromisin menghambat sintesis protein bakteri dengan mengikat secara reversibel ke subunit 50S ribosom.

Kesembilan, antibiotik gentamisin adalah golongan antibiotik aminoglikosida yang bekerja dengan cara berikatan dengan ribosom 30S dan menghambat sintesis protein. Terikatnya aminoglikosida pada ribosom ini mempercepat transport aminoglikosida ke dalam sel diikuti dengan kerusakan membrane sitoplasma dan disusul oleh kematian sel.

Kesepuluh, antibiotik ciprofloksasin adalah generasi kedua dari golongan fluoroquinolon, salah satu obat sintetik derivat quinolon.

Kesebelas, uji sensitivitas adalah metode untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik yang digunakan untuk pasien infeksi di RSUP Surakarta.

Keduabelas, zona hambat adalah daerah sekeliling cakram disk yang tidak ditumbuhi adanya *Staphylococcus aureus* kemudian diukur dengan jangka sorong.

Ketigabelas, sensitivitas adalah suatu keadaan dimana mikroba sangat sensitif terhadap antibiotik atau sensitivitas terhadap antibiotik yang masih efektif menghambat mikroba.

Keempatbelas, intermediet adalah suatu kondisi di mana seseorang bergerak dari sensitif menjadi resisten, tetapi tidak sepenuhnya resisten.

Kelimabelas, resisten adalah suatu kondisi dimana mikroorganisme sudah sensitif atau sudah kebal terhadap antibiotik.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat diantaranya cawan petri steril, jarum ose, tabung reaksi, inkas, lampu spiritus, timbangan analitik, penampungan steril, objek glass, mikroskop, pipet volume, batang pengaduk, pinset, kapas lidi steril, gelas ukur, beker, jangka sorong dan erlenmeyer.

### 2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Staphylococcus aureus* udara ruang rawat inap RSUP Surakarta pada bulan April-Juni 2023. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, larutan standart *McFarland* (0,5). Reagen untuk pengecatan gram yaitu, gram A (larutan kristal violet), gram B (*reugol's iodine*), gram C (etanol 95%), gram D (safranin). Media yang digunakan adalah *Vogel Jhonson Agar* (VJA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, SIM, KIA, Citrat,

reagen erlich A dan B, serum plasma kelinci, kalium tellurite, *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan *Brain Heart Infuction* (BHI). Cakram antibiotik azitromisin 15 µg, cakram antibiotik ciprofloksasin 5 µg, cakram antibiotik doksisisiklin 30 µg, cakram antibiotik eritromisin 15 µg, cakram antibiotik gentamisin 10 µg. Mikroorganisme pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

#### **D. Jalannya penelitian**

##### **1. Sterilisasi alat**

Alat-alat yang berbahan kaca dicuci dahulu sebelum digunakan, lalu keringkan, dan setelah kering dibungkus dengan kertas koran serta mulut wadah ditutup dengan kapas. Autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit untuk mensterilkan alat. Jarum ose dan pinset disterilisasikan dengan mencelupkan ke dalam alkohol 70% dan melakukan pemijaran menggunakan api bunsen (Armaleni, *et al.*, 2019).

##### **2. Penyiapan media**

Pertama, siapkan media *Vogel Jhonson Agar* sesuai yang dibutuhkan dan masukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dilarutkan dengan aquadest. Lalu, aduk sambil dipanaskan di atas *hot plate* hingga larut. Tutup lubang Erlenmeyer disumbat menggunakan kapas, kemudian Erlenmeyer dibungkus menggunakan kertas dan disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan yang sudah steril dimasukkan ke dalam cawan petri dan diamkan hingga dingin. Setelah itu, bisa digunakan (Suhartati, *et al.*, 2018).

##### **3. Isolasi bakteri penyebab infeksi nosokomial**

*Staphylococcus aureus* akan diambil secara acak dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta pada bulan April sampai Juni 2023 sebagai sampel penelitian ini. Sampel diambil pada ruang bangsal Nakula 2 dan Sadewa 2 dengan jumlah 30 sampel. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari dan sore hari. Pengambilan sampel dilakukan dengan meletakkan cawan petri yang berisi media VJA di ruang terbuka dan didiamkan selama 15 menit. Setelah 15 menit, tutup cawan petri berisi media dan dibungkus koran, kemudian sampel dibawa ke laboratorium dengan menggunakan coolbox. Media yang berisi sampel penelitian diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C dilanjutkan isolasi dengan metode gores dengan suhu 37°C selama 48

jam (Hayati, *et al.*, 2012). Koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri, dengan tiga uji yaitu uji morfologi, mikroskopis, dan biokimia.

#### **4. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus***

**4.1 Morfologi.** Bakteri hasil isolasi udara yang telah diinkubasi akan diidentifikasi dengan cara pemeriksaan koloni untuk mengamati ciri-ciri yang diduga *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan media *Vogel Jhonson Agar* (VJA) yang ditandai dengan koloni yang berwarna hitam, cembung, dan sekitar koloni yang berwarna kuning.

**4.2 Mikroskopis.** Identifikasi *Staphylococcus aureus* secara mikroskopis dilakukan dengan cara pewarnaan gram. Pertama siapkan terlebih dahulu obyek glass yang berfungsi untuk membuat preparat. Lalu, bersihkan seluruh kaca objek yang dengan alkohol 95%. Lakukan penyiapan bakteri yang diikuti fiksasi panas untuk masing-masing biakan. Kemudian pilih koloni yang diduga koloni *Staphylococcus aureus*. Tetesi sedikit dengan aquadest pada obyek glass, lalu ambil 1 ose bakteri dari koloni yang sudah dipilih kemudian lakukan pemerataan. Kedua, tetesi cat gram A (kristal violet) dan diamkan 1-2 menit dan dibilas kemudian keringkan. Ketiga, tetesi dengan cat gram B (lugol iodine) diamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dan keringkan. Keempat tetesi cat gram C (etanol alkohol) diamkan selama 1 menit, lalu dibilas dan dikeringkan. Kelima, teteskan cat gram D (safranin) diamkan selama 1 menit, lalu dibilas dan keringkan. Hasil diamati menggunakan alat mikroskop. Jika hasil menunjukkan positif, maka bakteri yang terlihat berwarna ungu, berbentuk anggur, dan tersusun tidak beraturan.

**4.3 Uji Biokimia.** Identifikasi bakteri secara uji biokimia dilakukan uji katalase yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Teteskan di atas object glass cairan  $H_2O_2$ , ambil satu ose inokulum dari VJA, letakkan dan campurkan. Katalase positif menunjukkan adanya gelembung gas ( $O_2$ ) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus aureus* (Toelle dan Lenda, 2014).

Uji koagulase dilakukan dengan tujuan untuk melihat enzim koagulase yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*. Uji ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri menggunakan jarum ose, lalu masukkan ke dalam 1 ml serum plasma kelinci dan inkubasi dengan suhu  $37^\circ C$  selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan

terdapatnya gumpalan seperti gel dalam tabung dan hasil negatifnya tidak adanya gumpalan yang menyerupai gel pada tabung (SNI, 2015).

Uji *Sulfide Indole Motility* (SIM) merupakan media yang semi solid yang mengandung Nutrisi (salah satunya peptone yang mengandung asam amino termasuk triptofan), iron, dan natrium thiosulfat. Isolat bakteri yang telah diperoleh diinokulasi dengan cara ditusuk pada media SIM dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Hasil positif pada motil apabila terdapat pertumbuhan bakteri yang akan menyebar menjauhi garis di sekitar bekas tusukan jarum pada medium dan hasil negatif (non motil) jika pertumbuhan koloni bakteri hanya berbentuk garis (Ismail dan Fariedah, 2014). Selanjutnya pada masing-masing isolat ditambahkan beberapa senyawa kovacks, untuk melihat produksi senyawa indol. Hasil positif pada indol ditunjukkan dengan terlihatnya cincin merah pada permukaan medium. Hasil positif pada sulfida ditandai dengan perubahan warna hitam pada media (Sardiani, *et al.*, 2015).

Uji citrat bertujuan berfungsi untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal dan energi. Isolat diinokulasi pada medium miring SCA secara vertikal, dengan menggunakan metode goresan zig-zag pada bagian miring dan ditusukkan pada bagian dasar. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi biru dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Anggraini, *et al.*, 2016).

Uji KIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida. Uji ini dibuat dalam tabung reaksi, diambil satu ose bakteri dengan menggunakan jarum ose, lalu ditusukkan ke dalam media. Perubahan yang diamati setelah inkubasi adalah warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa, warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H<sub>2</sub>S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas (Sardiani, *et al.*, 2015).

## **5. Pembuatan suspensi bakteri**

Pertama, biakan *Staphylococcus aureus* dengan cara mengambil dari sampel satu ose, kemudian diinokulasikan pada media VJA dan masukkan ke dalam inkubator. Kedua, ambil sebanyak 1 koloni

*Staphylococcus aureus* dari media VJA. Ketiga, membuat suspensi bakteri dengan cara menginokulasikan isolate pada media cair *Brain Heart Infusion* (BHI). Selanjutnya, bakteri disuspensikan ke BHI dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan suspensi biakan dibuat setara *Standar McFarland* 0,5 dengan jumlah sel  $1,5 \times 10^8$  CFU pada jumlah sel yang sama.

## 6. Cara uji sensitivitas

Pada uji sensitivitas menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Pertama, media *Muller Hunton Agar* (MHA) yang telah disterilkan dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Kedua, disetarakan dengan suspensi kuman dengan *Turbidity Standard McFarland* 0,5. Selanjutnya kapas lidi steril dimasukkan ke dalam suspensi bakteri yang sudah mengandung *Staphylococcus aureus*, baik dari sampel maupun bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Lalu diinokulasi ke dalam media MHA dengan metode pemerataan (*Spread Plate Methode*). Media didiamkan selama 10 menit dengan suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Letakkan kertas cakram antibiotik azitromisin 15 µg, ciprofloksasin 5 µg, doksisisiklin 30 µg, eritromisin 15 µg dan cakram antibiotik gentamisin 10 µg pada media MHA dengan jarak yang sama. Ketiga, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi hasil diamati dengan menggunakan jangka sorong dan penggaris untuk mengukur diameter zona hambat dan sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan persepuluh mm. Keempat, replikasi diulang sebanyak 3 kali selama pengujian. Pedoman CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) tahun 2020 digunakan untuk membandingkan hasil zona hambatan dan digolongkan menjadi sensitif, *intermediate*, dan resistensi.

### E. Analisis Data

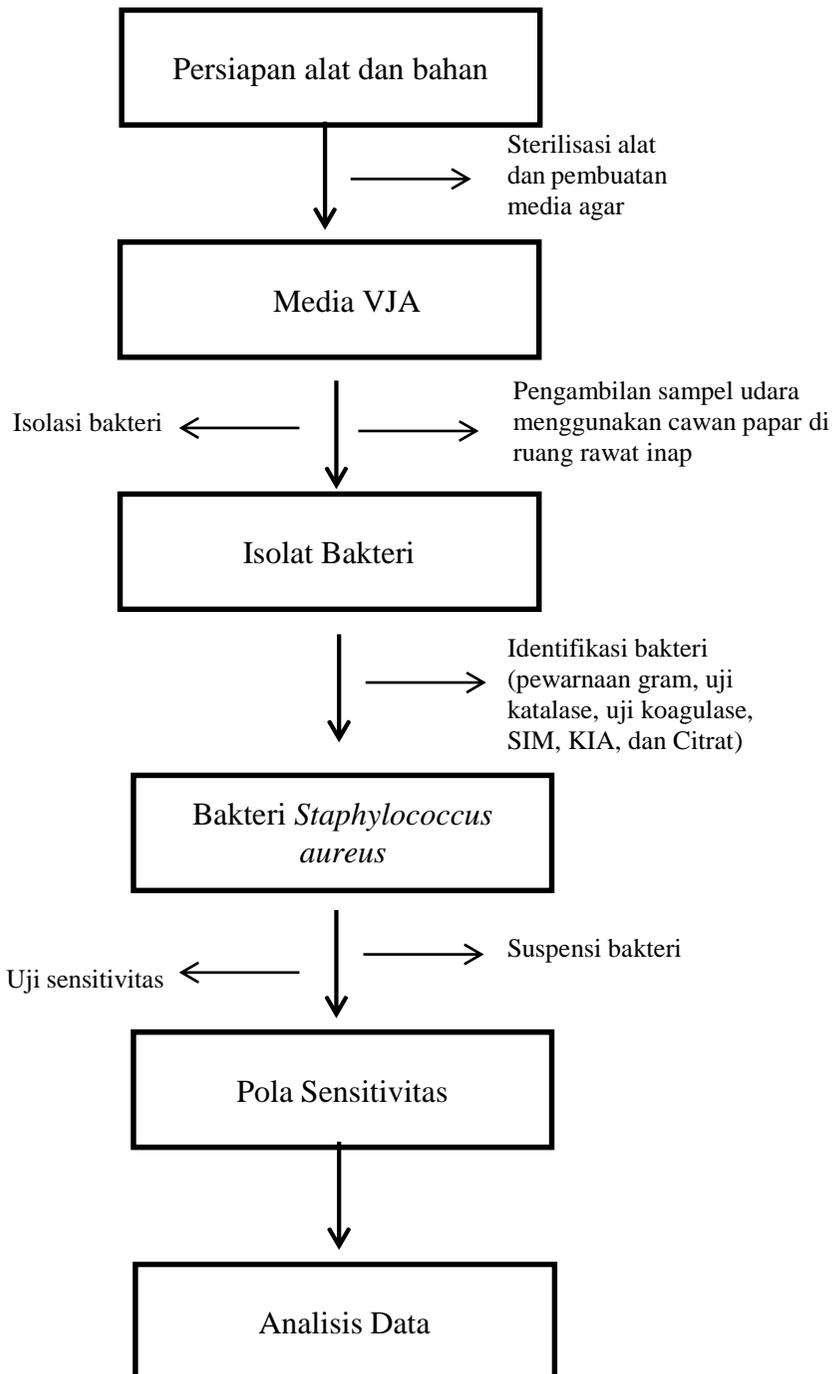
Penelitian mendapatkan hasil berupa zona hambat dari beberapa antibiotik azitromisin, ciprofloksasin, doksisisiklin, eritromisin, gentamisin yang kemudian diolah secara deskriptif untuk mengetahui pola bakteri sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dari udara ruang rawat inap RSUP Surakarta bulan April-Juni 2023 serta dilakukan analisis dengan replikasi sebanyak 3x. Analisis data digunakan untuk membandingkan hasil zona hambat *Staphylococcus aureus* dari udara ruang rawat inap dengan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berdasarkan tabel 1. Zona Diameter Bakteri *Staphylococcus aureus*.

**Tabel 1. Zona Diameter Bakteri *Staphylococcus aureus***

Antibiotik	Disk content ( $\mu\text{g}$ )	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Sensitif (S)	Intermediate (I)	Resistensi (R)
Azitromisin	15 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$
Ciprofloksasin	5 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
Doksisisiklin	30 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	13-15	$\leq 12$
Eritromisin	15 $\mu\text{g}$	$\geq 23$	14-22	$\leq 13$
Gentamisin	10 $\mu\text{g}$	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$

Sumber : *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tahun 2020*

## F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema Penelitian