

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *descriptive analitic* karena tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas mikrobiologi udara ruang NICU RSUD Abdul Moeloek.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober-November 2014 di ruang NICU Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung untuk mengambil sampel mikroba udara. Kemudian dilakukan pemeriksaan sampel di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

#### **3.3 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian yang digunakan adalah udara ruangan NICU RSUD Abdul Moeloek.

#### **3.4 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam percobaan ini yaitu: cawan petri, tabung reaksi, tabung erlenmeyer, gelas kimia, corong, lampu bunsen, ose bulat dan ose jarum, mikroskop, pipet tetes, autoklaf, inkubator dengan pengaturan suhu

37°C dan 25°C, stir magnet, kaca objek, kaca penutup dan bahan-bahan lain yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi.

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian adalah : *plate count agar*, *saboraud dekstrose agar*, agar SIM (Sulfur, Indol, Motilitas), *nutrient broth* (NB), gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), *simon citrate*, TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), pewarnaan gram (Gentian violet, lugol, alkohol 70%, safranin), aquades, pewarnaan LPCB (Lactophenol Cotton Blue).

### 3.5 Prosedur penelitian

#### a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara meletakkan media PCA (*Plate Count Agar*) untuk media pertumbuhan mikroorganisme yang ada di udara. Media pada cawan petri diletakkan terbuka 5 titik dalam ruangan NICU dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya media dalam cawan ditutup kembali dengan parafilm dan dimasukkan dalam termos es untuk diperiksa di laboratorium.

#### b. Penanaman dan Pembiakan

Media yang berisi sampel diinkubasi dalam media inkubasi. Media PCA diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam untuk memberikan waktu bakteri tumbuh sedangkan media SDA diinkubasi selama 1-2 minggu pada suhu 25°C. Setelah masa inkubasi selesai selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri secara keseluruhan dan

dilanjutkan dengan pewarnaan Gram, sedangkan untuk koloni jamur dilakukan pewarnaan jamur.

Media PCA yang berisi sampel penelitian diinkubasi dengan keadaan terbalik pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam dan media SDA diinkubasi pada suhu 25°C selama 1-2 minggu. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung jumlahnya lalu dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan isolasi bakteri, sedangkan untuk koloni jamur yang tumbuh dilanjutkan dengan pewarnaan jamur.

c. Penghitungan Angka kuman

Perhitungan koloni mikroorganismenya yang tumbuh setelah diinkubasi dilakukan dengan syarat-syarat berikut:

1. Tiap koloni yang tumbuh baik besar, kecil maupun koloni yang menjalar dihitung sebagai 1 koloni.
2. Perhitungan koloni dilakukan secara manual dengan menghitung koloni yang ada dan juga bisa dilakukan dengan menggunakan *coloni counter*.
3. Perhitungan angka kuman dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Indeks Angka Kuman} = \frac{\text{Jumlah Koloni (CFU)}}{\text{Volume Ruang NICU (m}^3\text{)}}$$

Berdasarkan PERMENKES tahun 2004, indeks angka kuman untuk ruangan NICU adalah 200 CFU/m<sup>3</sup>

d. Isolasi Bakteri

Bakteri yang telah dihitug selanjutnya dilakukan isolasi dengan cara ditanamkan dalam agar darah untuk mengidentifikasi bakteri gram positif dan ditanamkan kedalam agar Mac Conkey untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif. Masing-masing agar diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

e. Identifikasi Mikroorganisme

Identifikasi mikroorganisme dilakukan dengan langkah berikut :

1. Makroskopis

Identifikasi secara makroskopis dengan menggunakan pengamatan untuk melihat karakteristik koloni bakteri dan jamur berdasarkan bentuk, warna, dan permukaan koloni.

2. Mikroskopis

Identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan cara yang berbeda untuk masing-masing mikroorganisme yaitu :

- a. Bakteri diidentifikasi dengan menggunakan pewarnaan gram untuk melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap warna.

Langkah kerja pewarnaan gram :

1. Gelas objek difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api dengan nyala kecil selama beberapa saat.
2. Dibuat olesan tipis isolate bakteri dengan menggunakan ose bulat secara septis, kemudian dikeringkan dan difiksasi di atas nyala api kecil.

3. Olesan yang telah dibuat ditetesi dengan kristal violet (Gram A = cat utama) sampai menutupi seluruh sediaan, dan diamkan selama 1 menit kemudian cuci dengan air mengalir dengan perlahan.
  4. Ditetesi olesan tersebut dengan larutan iodine (Gram B = larutan mordant), dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci pada air mengalir secara perlahan hingga tetesan menjadi bening.
  5. Kemudian dilakukan dekolorisasi dengan ditetesi etil alkohol 95% (Gram C) selama 10-30 detik sampai terlihat adanya warna yang luntur dari olesan, dan segera aliri dengan air selama beberapa detik untuk menghentikan aktivitas dekolorisasi.
  6. Langkah selanjutnya bakteri ditetesi dengan safranin selama 20-30 detik, dan dicuci dengan air mengalir secara perlahan selama beberapa detik untuk menghabiskan sisa-sisa pewarnaan sampai bersih dan dikeringkan. Setelah itu diamati dengan mikroskop untuk melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap zat warna.
- b. Jamur diidentifikasi dengan menggunakan metode pewarnaan jamur Lactophenol Cotton Blue (LPCB) untuk melihat miselium, tipe hifa dan kantong spora dari jamur

Langkah kerja pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) untuk jamur :

1. Ditetesi satu tetes *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) pada gelas objek.
2. Diambil bahan pemeriksaan dengan menggunakan ose bulat kemudian diletakkan pada gelas objek tersebut. Setelah itu ditutup dengan menggunakan kaca objek.
3. Didiamkan selama 10 menit, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x atau 100x untuk melihat miselium, tipe hifa, dan kantung spora.

f. Identifikasi secara biokimia dilakukan dengan cara berikut :

a) Untuk bakteri Gram positif

1. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara koloni diletakkan pada gelas objek sebanyak satu ose kemudian cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ditetaskan pada gelas objek tersebut. Hasil positif apabila terdapat gelembung udara yang menandakan bakteri yang berkembang adalah *Staphylococcus sp.* dan hasil negatif apabila tidak terdapat gelembung udara yang menandakan bakteri yang berkembang adalah *Streptococcus sp.*

2. Uji gula-gula

Uji gula-gula menggunakan media gula-gula yaitu berupa glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Uji ini

dilakukan karena sifat bakteri yang bisa menfermentasikan gula. Hasil bernilai positif ditandai dengan terjadinya perubahan dari biru menjadi hijau atau kuning menandakan bakteri tersebut menghasilkan asam, serta adanya gelembung udara pada tabung Durham menandakan bakteri tersebut menghasilkan gas.

### 3. Uji SIM

Dengan menggunakan Agar SIM yang merupakan agar semisolid dan digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfide, timbulnya indol akibat enzim *tryptophanase* yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta motilitas atau pergerakan bakteri.

### 4. Uji DNase

Dengan menggunakan DNase agar plate, bakteri ditanamkan kedalam media tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya koloni akan digenangi dengan larutan HCL10% selama 1-2 menit. Hasil bernilai positif apabila terdapat zona bening pada agar tersebut yang menandakan adanya *Staphylococcus aureus* dan bernilai negatif apabila tidak terdapat zona bening pada agar.

### 5. Uji Fermentasi Glukosa

Pengujian dilakukan dengan memasukkan bakteri sebanyak satu ose kedalam larutan glukosa 5 ml dan diinkubasi

selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. apabila didapatkan perubahan warna menjadi hijau atau kuning artinya terdapat *Staphylococcus epidermidis* dan apabila larutan berubah menjadi biru menandakan adanya *Staphylococcus saprophyticus*.

#### b) Bakteri Gram Negatif

##### 1. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Media TSIA digunakan untuk menilai kemampuan bakteri memfermentasi gula berupa glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hal ini ditandai dengan perubahan warna akibat timbulnya suasana asam, serta terbentuknya H<sub>2</sub>S. Media diamati pada 2 tempat, yaitu bagian lereng dan bagian dasar.

##### 2. Uji Sitrat

Uji ini bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menggunakan natrium sitrat sebagai sumber utama metabolisme dan pertumbuhan. Didapatkan hasil yang positif apabila agar sitrat yang semula berwarna hijau berubah menjadi biru yang timbul akibat suasana asam

##### 3. Uji gula-gula

Uji gula-gula menggunakan media gula-gula yaitu berupa glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Uji ini dilakukan karena sifat bakteri yang bisa menfermentasikan gula. Hasil bernilai positif ditandai dengan terjadinya



perubahan dari biru menjadi hijau atau kuning menandakan bakteri tersebut menghasilkan asam, serta adanya gelembung udara pada tabung Durham menandakan bakteri tersebut menghasilkan gas.

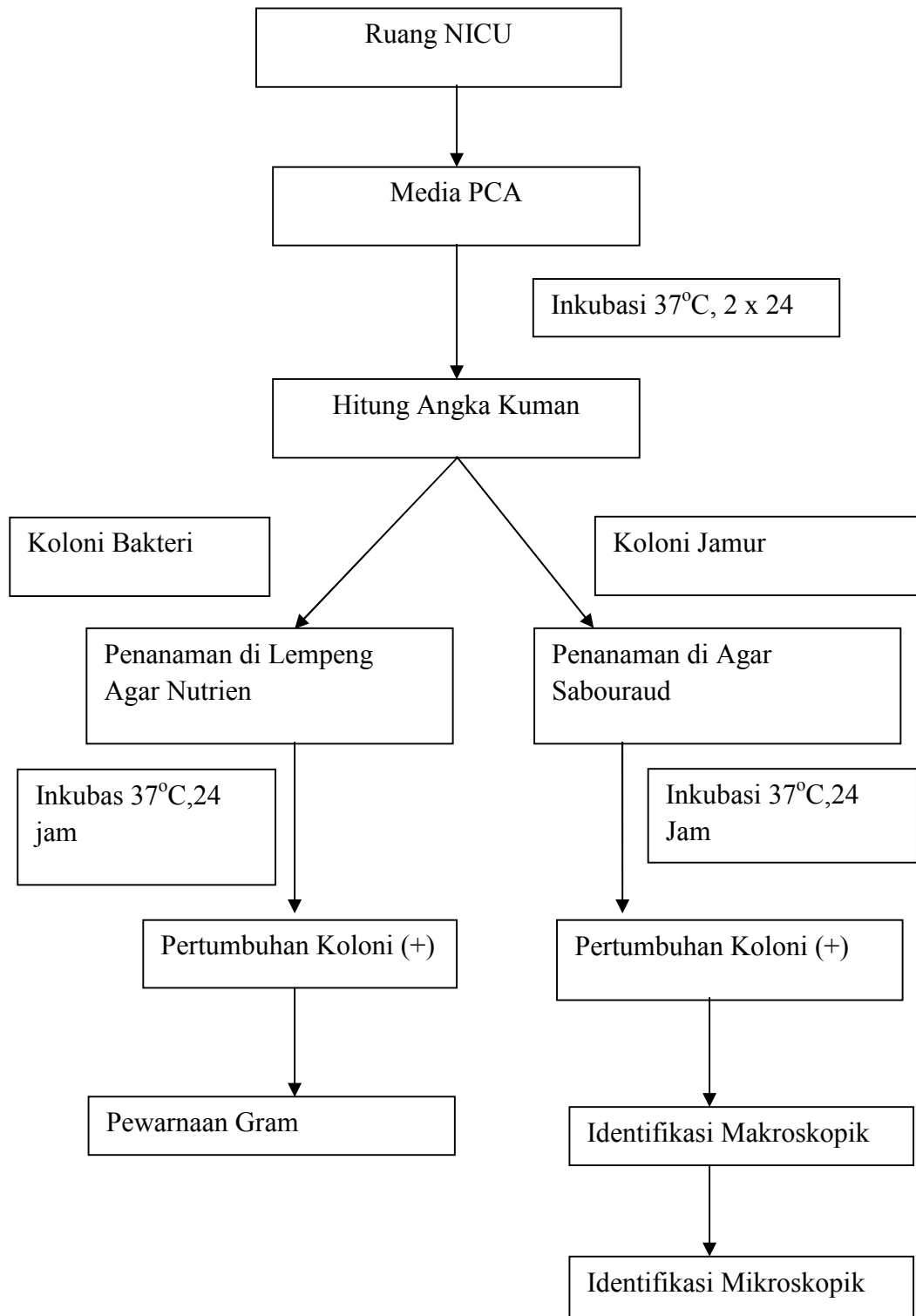
#### 4. Uji SIM

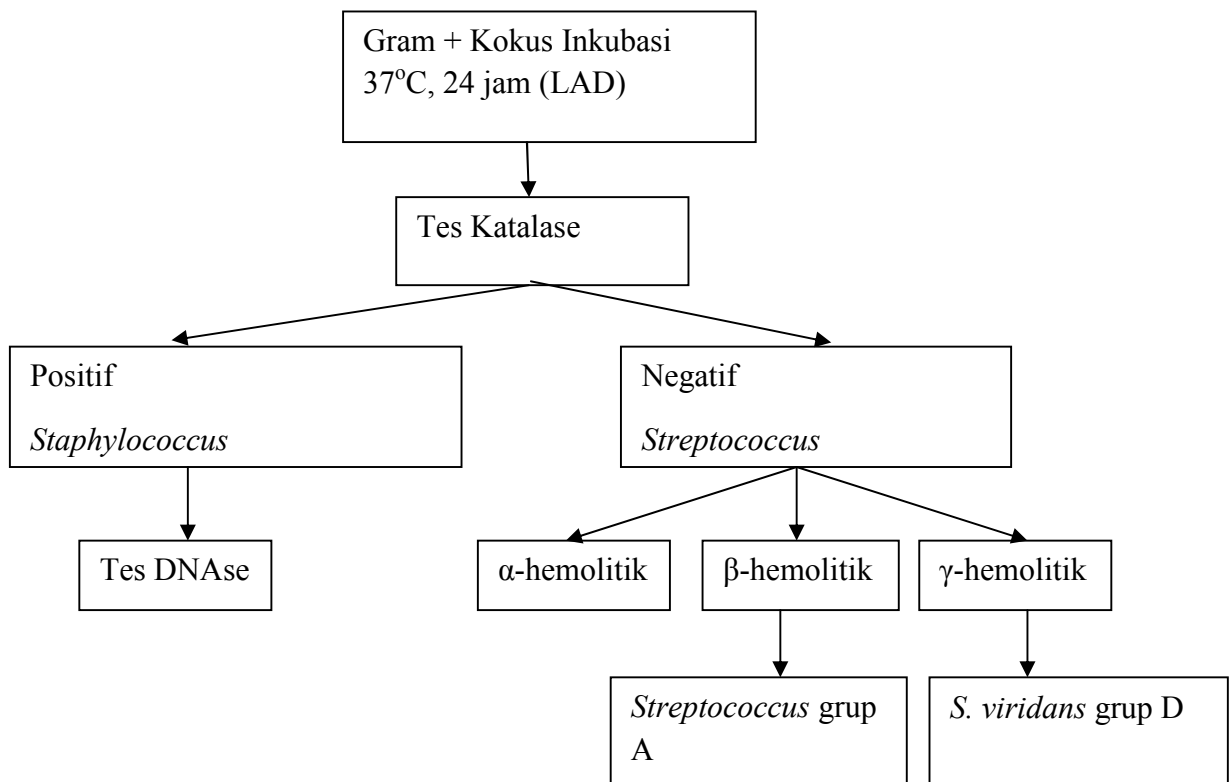
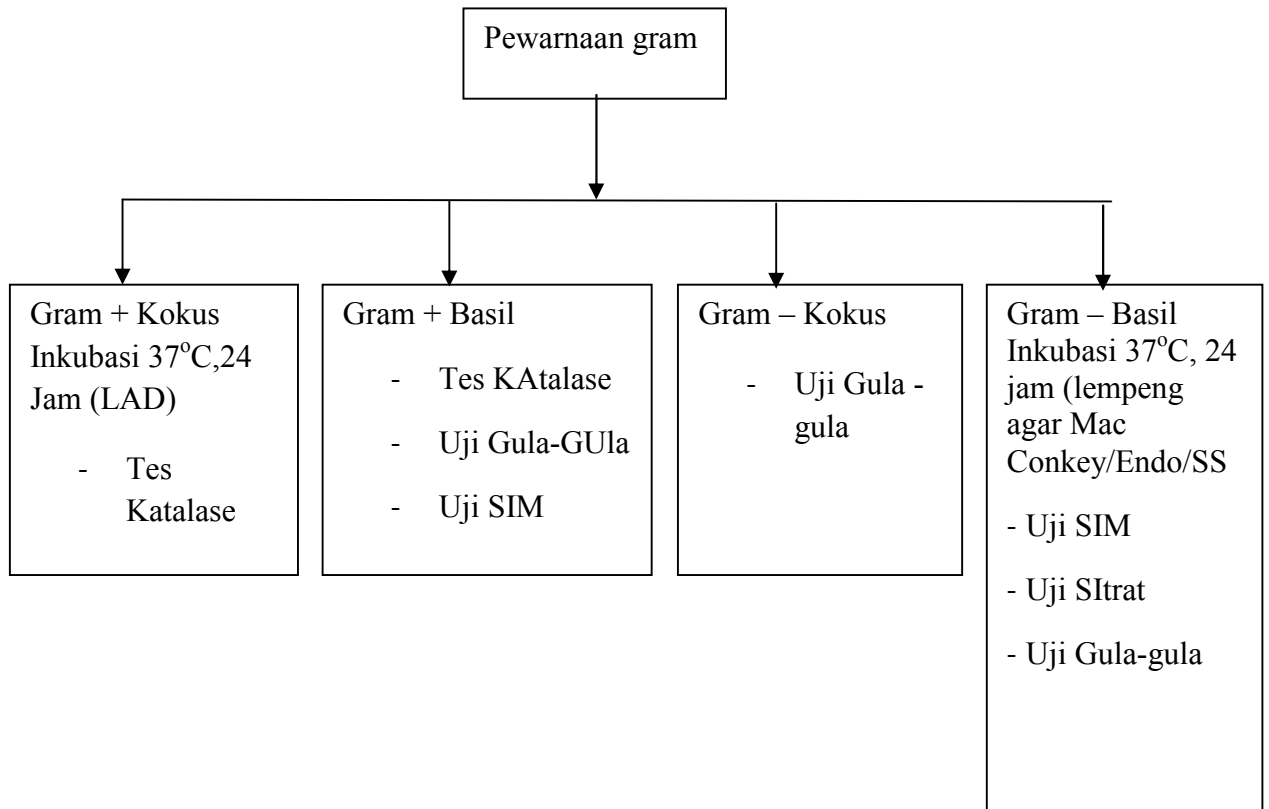
Mempunyai tujuan yang sama pada penilaian bakteri Gram positif digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfide, timbulnya indol akibat enzim *tryptophanase* yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta motilitas atau pergerakan bakteri.

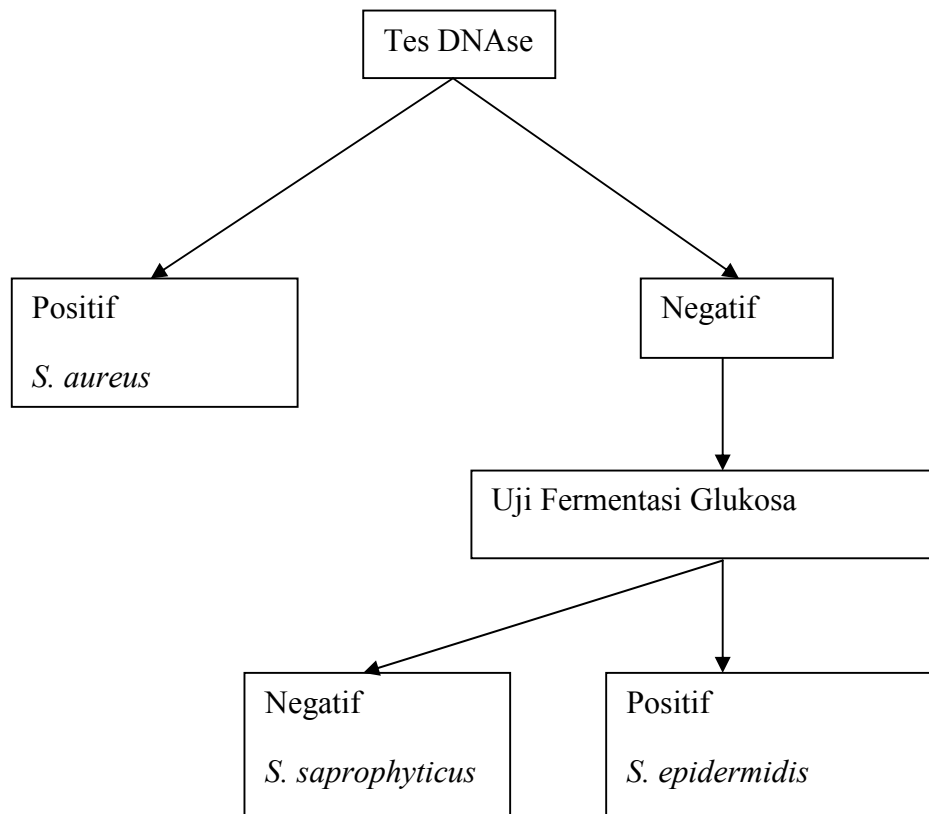
#### 5. Uji Oksidase

Dilakukan dengan cara koloni bakteri ditetaskan dengan reagen oksidase kemudian didiamkan beberapa saat dan apabila terdapat perubahan warna menjadi merah muda atau hitam maka hasilnya adalah positif.

### 3.6 Rancangan Penelitian







**Gambar 4.** Rancangan penelitian

### 3.7 Definisi Operational

**Tabel 4.** Definisi Operational

Variabel	Definisi	Kategori	Cara ukur	Skala
Kualitas mikrobiologi udara ruang NICU	Mikroorganisme yang terdapat pada ruang NICU	Tidak Baik Baik	>200 CFU/m <sup>3</sup> <200 CFU/m <sup>3</sup>	Kategorik
Identifikasi bakteri dan jamur pada udara ruang NICU	Mengetahui jenis bakteri dan jamur pada ruang NICU	Bakteri dan jamur	Diidentifikasi dengan pewarnaan gram dan tes biokimiawi	Kategorik

### 3.8 Penyajian Data

Data disajikan dalam bentuk tabel

### 3.9 Etika penelitian

Penelitian ini sudah melalui uji etik dan dinyatakan lulus uji etik sehingga bisa dilaksanakan.