

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Deskriptif karena tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas mikrobiologi pada udara di inkubator Unit Perinatologi RSUD Dr. Abdul Moeloek dengan melakukan isolasi dan identifikasi mikroorganisme (bakteri dan jamur), serta penghitung angka kuman udara dengan metode Total Plate Count (TPC).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan pada bulan Desember-Januari 2012. Pengambilan sampel dilakukan di Unit Perinatologi RSUD Dr. Abdul Moeloek dan pemeriksaan serta analisis sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah mikroorganisme udara di seluruh ruangan yang berada di unit perinatologi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Abdul Moeloek. Sampel penelitian adalah mikroorganisme udara pada inkubator bayi unit perinatologi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Abdul Moeloek Bandar Lampung sebanyak 16 inkubator.

D. Alat dan Bahan

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Cawan petri
2. Tabung reaksi
3. Tabung Erlenmeyer
4. Gelas kimia
5. Corong
6. Lampu Bunsen
7. Ose bulat dan ose jarum
8. Mikroskop
9. Pipet tetes
10. Autoklaf
11. Inkubator dengan pengaturan suhu 37°C dan 25°C
12. Stir magnet
13. Kaca Objek
14. Kaca Penutup dan bahan-bahan lain yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi.

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian adalah :

1. Plate Count Agar
2. Saboraud Dekstrose Agar
3. Agar SIM (Sulfur, Indol, Motilitas)
4. Nutrient broth (NB)
5. Gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol)
6. Simon Citrat
7. TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
8. Pewarnaan Gram (Gentian violet, lugol, alkohol 70%, safranin)
9. Aquades
10. Pewarnaan LPCB (Lactophenol Cotton Blue)

E. Prosedur Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Cawan petri yang telah berisi media PCA (Plate Count Agar) dan SDA (Saboraud Dekstrose Agar) diletakkan dan dibuka selama 15 menit di dalam inkubator bayi yang diperiksa. Setelah itu cawan petri ditutup dengan parafilm dan disimpan di dalam termos es selama perjalanan menuju laboratorium.

b. Penanaman dan Pembiakan

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

Koloni kuman yang tumbuh setelah diinkubasi dihitung dengan persyaratan sebagai berikut:

1. Koloni besar, kecil, menjalar dihitung 1 koloni karena dianggap berasal dari satu bakteri.
2. Penghitungan dapat dilakukan secara manual dengan memberi tanda titik pada koloni yang sudah dihitung (Soemarno, 2000).
3. Menurut Permenkes indeks angka kuman yang didapat diberi satuan CFU/m³, indeks angka kuman dihitung dengan rumus:

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

Keterangan :

$$\text{Volume Inkubator} = 0,12255 \text{ m}^3$$

Tidak ada persyaratan batas maksimal angka kuman udara inkubator yang ditetapkan. Akan tetapi, inkubator termasuk dalam ruang perawatan bayi dan prematur, maka persyaratan angka kuman bisa mengacu pada persyaratan angka kuman berdasarkan fungsi ruang dan unit di ruang perawatan bayi dan prematur yang ditetapkan Permenkes yaitu 200 cfu/m³.

d. Isolasi Bakteri

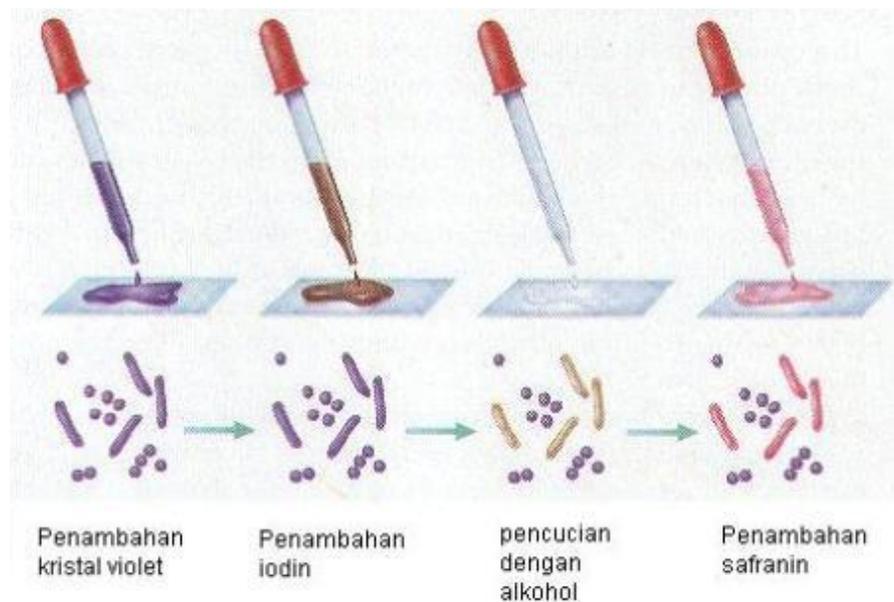
Setelah koloni bakteri tumbuh pada media PCA dan dihitung, masing-masing koloni bakteri ditanam di media agar darah untuk pembiakan bakteri gram positif dan media agar Mac Conkey untuk pembiakan bakteri gram negatif. Diawali dengan mengambil koloni menggunakan ose, diratakan di seluruh permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Soemarno, 2000).

e. Identifikasi Mikroorganisme dilakukan dengan tiga tahap, yaitu:

1. Identifikasi mikroorganisme secara makroskopis untuk melihat karakteristik koloni bakteri dan jamur berdasarkan bentuk, warna, dan permukaan koloni.
2. Identifikasi mikroorganisme secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram untuk bakteri yang tumbuh pada media PCA dilakukan untuk melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap zat warna dengan pengamatan menggunakan mikroskop. Jamur pada media SDA diidentifikasi dengan pewarnaan jamur Lactophenol Cotton Blue (LPCB) untuk melihat miselium, tipe hifa (Stolon, Rhizoid, Sporangiosphore), dan kantung spora.

Langkah kerja pewarnaan gram :

1. Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api Bunsen sehingga bebas dari kotoran dan lemak.
2. Membuat olesan tipis isolat bakteri dengan jarum ose secara aseptis, dikeringkan, dan difiksasi dengan melewati di atas api Bunsen sebanyak tiga kali.
3. Olesan tersebut ditetesi kristal violet (Gram A = cat utama) sampai menutupi seluruh sediaan, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci pada air mengalir.



Gambar 3. Pewarnaan Gram

4. Kemudian ditetesi dengan larutan iodin (Gram B = larutan mordan), dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci pada air mengalir hingga tetesan menjadi bening.

5. Lalu dilakukan dekolorisasi dengan ditetesi etil alkohol 95% (Gram C) selama 10-30 detik sampai terlihat adanya warna yang luntur, segera aliri dengan air selama beberapa detik untuk menghentikan aktivitas dekolorisasi.
6. Selanjutnya bakteri ditetesi dengan safranin selama 20-30 detik, dicuci dengan air mengalir selama beberapa detik untuk menghabiskan sisa-sisa cat sampai bersih dan dikeringkan. Setelah itu diamati dengan mikroskop untuk melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap zat warna.

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

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

f. Selanjutnya dilakukan identifikasi hasil biakan dengan uji biokimia yaitu :

a) Bakteri Gram Positif

1. Uji Katalase

Cairan H_2O_2 ditetesi pada kaca objek pada koloni yang diambil sebanyak satu ose. Hasil positif apabila terdapat gelembung udara yang menandakan *Staphylococcus sp.* dan hasil negatif apabila tidak terdapat gelembung udara yang menandakan *Streptococcus sp.* (Steven *et al.*, 2004).

2. Uji gula-gula

Media gula-gula yang dipakai yaitu berupa glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Uji ini didasarkan atas kemampuan bakteri untuk memfermentasi gula-gula tersebut. Tujuannya adalah untuk mengetahui bakteri yang menghasilkan gas dan asam. Jika hasil 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 (Steven *et al.*, 2004).

3. Uji SIM

Agar SIM merupakan agar semisolid yang digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfide, timbulnya indol akibat enzim *tryptophanase* yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta motilitas atau pergerakan bakteri (Steven *et al.*, 2004).

b) Bakteri Gram Negatif

1. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Media TSIA digunakan untuk menilai kemampuan bakteri memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hal ini ditandai dengan perubahan warna akibat timbulnya suasana asam, serta terbentuknya H₂S dan gas. Media diamati pada 2 tempat, yaitu bagian lereng dan bagian dasar (Steven *et al.*, 2004).

2. Uji Sitrat

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai sumber utama metabolisme dan pertumbuhan. Hasil positif apabila agar sitrat yang semula berwarna hijau berubah menjadi biru yang timbul akibat suasana asam (Steven *et al.*, 2004).

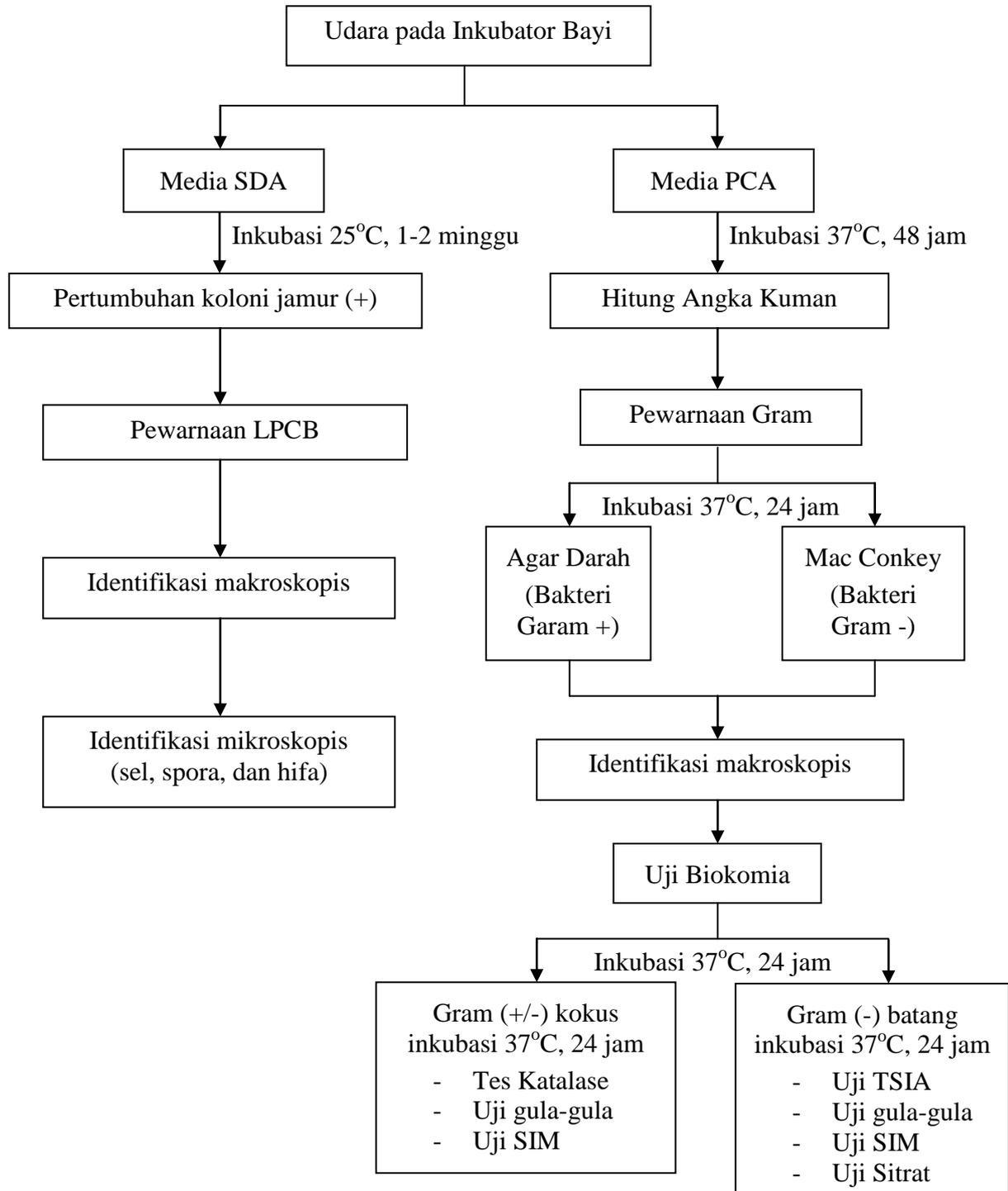
3. Uji gula-gula

Media gula-gula yang dipakai yaitu berupa glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Uji ini didasarkan atas kemampuan bakteri untuk memfermentasi gula-gula tersebut. Tujuannya adalah untuk mengetahui bakteri yang menghasilkan gas dan asam. Jika hasil 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 (Steven *et al.*, 2004).

4. Uji SIM

Agar SIM merupakan agar semisolid yang digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfide, timbulnya indol akibat enzim *tryptophanase* yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta motilitas atau pergerakan bakteri (Steven *et al.*, 2004).

F. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

G. Definisi Operational

Table 2. Definisi Operational

Variabel	Definisi	Cara ukur
Kualitas Mikrobiologi Udara	Mikroorganisme udara baik itu dari lingkungan luar (jamur, spora) maupun dari dalam ruang (bakteri) yang mempengaruhi kualitas atau mutu udara dalam suatu ruangan	Penghitungan angka kuman (Jumlah) Identifikasi mikroorganisme udara (Jenis Mikroorganisme)
Indeks Angka kuman	Jumlah kuman yang didasarkan pada asumsi bahwa setiap sel kuman hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah diinkubasikan dalam media biakan dan lingkungan yang sesuai.	Penghitungan angka kuman udara di inkubator dengan metode Total Plate Count. Dihitung dengan rumus : $\text{Indeks Angka Kuman} = \frac{\text{Jumlah Koloni (CFU)}}{\text{Vol. Inkubator Bayi (m}^3\text{)}}$

H. Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.