

SEBARAN PROFIL BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN PROFIL RESISTENSI ANTIBIOTIKNYA PADA SALURAN PEMBUANGAN LIMBAH AIR PADA SALAH SATU RUMAH SAKIT TIPE C DI MALANG

Ananda Dwie Syah Putra, Citra Destya Rahma Putri, Raden Muhammad Hardadi Airlangga*
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Limbah air rumah sakit mengandung berbagai senyawa kimia dan juga mikroorganisme oportunistik maupun patogenik. Adanya instalasi pengolahan air limbah (IPAL) dapat mengurangi terjadinya penyebaran bakteri dan senyawa kimia menuju lingkungan. Namun, terdapat kemungkinan bahwa bakteri dan senyawa kimia dapat tidak tereliminasi dari IPAL sehingga akan tersebar menuju lingkungan. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri oportunistik yang terdapat pada limbah air rumah sakit dan merupakan salah satu bakteri yang mudah mengalami resistensi terhadap antibiotik. Berdasarkan uraian tersebut, diperlukan penelitian untuk menganalisis sebaran profil bakteri dan profil resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada limbah air rumah sakit sebagai salah satu cara untuk mengurangi dan mencegah terjadinya pencemaran lingkungan yang disebabkan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini termasuk jenis studi eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *in vitro*. Penelitian dilakukan dengan melakukan kultur bakteri yang berasal dari sampel limbah air rumah sakit dan dilakukan uji resistensi terhadap antibiotik melalui metode Kirby-Bauer dengan tingkat kepercayaan sebesar 80%. Didapatkan bahwa sampel limbah air yang belum memasuki IPAL mengandung bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan rata-rata sebesar 2.7×10^4 CFU/ml sementara sampel limbah air yang sudah memasuki IPAL mengandung bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 9.07×10^2 CFU/ml. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan pada kedua sampel memiliki tingkat resistensi yang rendah terhadap antibiotik Meropenem, Ceftazidime, Ciprofloxacin, dan Gentamicin. Temuan pada penelitian ini dapat mengindikasikan ketidakefektifan sistem IPAL karena adanya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan setelah memasuki IPAL. Disamping itu, temuan pada penelitian ini membuktikan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada limbah air yang dikeluarkan masih berada diatas standar yang telah ditetapkan.

Kata Kunci: Limbah air rumah sakit; *Pseudomonas aeruginosa*; tingkat resistensi terhadap antibiotik

*Penulis Korespondensi:

dr. H. R. M. Hardadi Airlangga, Sp.PD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

ANALYSIS OF *Pseudomonas aeruginosa* LEVEL AND ITS RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN THE HOSPITAL WASTEWATER AT ONE OF TYPE C HOSPITAL IN MALANG

Ananda Dwie Syah Putra, Citra Destya Rahma Putri, Raden Muhammad Hardadi Airlangga*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Hospital wastewater contains various chemical compounds as well as opportunistic and pathogenic microorganisms. The existence of a wastewater treatment plant (WWTP) can reduce the spread of bacteria and chemical compounds into the environment. However, there is a possibility that bacteria and chemical compounds may not be eliminated from the WWTP and will spread into the environment. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the opportunistic bacteria found in hospital wastewater and is one of the bacteria that easily becomes resistant to antibiotics. Based on this description, research is needed to analyze the distribution of bacterial profiles and resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wastewater as a way to reduce and prevent environmental pollution caused by *Pseudomonas aeruginosa*. This research is a type of laboratory experimental study with an *in vitro* research design. The research was carried out by culturing bacteria from hospital wastewater samples and testing antibiotic resistance using the Kirby-Bauer method with a confidence level of 80%. It was found that wastewater samples that had not yet entered the WWTP contained *Pseudomonas aeruginosa* with an average of 2.7×10^4 CFU/ml while wastewater samples that had entered the WWTP contained *Pseudomonas aeruginosa* of 9.07×10^2 CFU/ml. The *Pseudomonas aeruginosa* bacteria found in both samples had a low level of resistance to the antibiotics Meropenem, Ceftazidime, Ciprofloxacin, and Gentamicin. The findings in this study may indicate the ineffectiveness of the WWTP system due to the presence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria which were obtained after entering the WWTP. Besides that, the findings in this study prove that the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in the waste water released is still above the established standards.

Keyword: Hospital wastewater (HWW); *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotic resistance

*Correspondence Author:

dr. H. R. M. Hardadi Airlangga, Sp.PD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

PENDAHULUAN

Limbah air rumah sakit berasal dari seluruh kegiatan pada rumah sakit, baik yang bersangkutan dengan kegiatan medis maupun non-medis (1). Kegiatan medis maupun non medis dapat menyebabkan terbuangnya senyawa obat-obatan maupun senyawa kimia dalam bentuk aktif maupun termetabolit ke dalam saluran pembuangan air (2). Senyawa obat-obatan maupun senyawa kimia yang digunakan dalam pengobatan tidak termetabolisme secara sempurna sehingga akan diekskresikan oleh tubuh manusia dan terbuang menuju saluran pembuangan air (3). Selain itu, adanya penggunaan antibiotik pada pasien yang dirawat di rumah sakit dapat menyebabkan penyebaran senyawa antibiotik yang merupakan hasil metabolisme maupun yang tidak termetabolisme pada limbah air rumah sakit melalui urin dan feses pasien (4). Limbah air ini nantinya akan memasuki sistem pengolahan limbah air rumah sakit.

Setelah mengalami pengolahan limbah pada rumah sakit, limbah air rumah sakit umumnya akan disalurkan bersama limbah air yang berasal dari pemukiman warga dan akan dilakukan pengolahan lanjutan (5). Sebelum memasuki pengolahan limbah lanjutan, limbah air rumah sakit harus memenuhi standar yang telah ditetapkan pada Peraturan Menteri Lingkungan Hidup nomor 5 tahun 2014 tentang baku mutu air limbah. Dalam hal ini, limbah air rumah sakit harus memenuhi parameter biologi yang merujuk pada total bakteri *coliform* yang didapatkan setelah pengolahan memiliki nilai kurang dari 5000 MPN/100 ml (6).

Limbah air rumah sakit merupakan media pertumbuhan yang ideal bagi mikroorganisme, terutama bakteri, virus, protozoa, serta dapat menjadi sumber bakteri resisten antibiotik (7). Beberapa bakteri Gram negatif yang umum terdapat pada limbah air rumah sakit adalah *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Leptospira*, dan bakteri coliform seperti *Enterobacter*, *Klebsiella*, dan *Escherichia coli* (7). Sementara bakteri Gram positif yang banyak terdapat pada limbah air rumah sakit seperti *Staphylococcus sp.* (8).

Sebagian besar bakteri akan tereliminasi pada saat limbah air rumah sakit terolah, namun terdapat kemungkinan adanya sebagian kecil bakteri patogenik yang resisten maupun tidak resisten antibiotik dapat tidak tereliminasi sehingga dapat menyebabkan penyebaran bakteri pada lingkungan (9). Bakteri mengalami

resistensi terhadap antibiotik melalui induksi mutase genetik yang disebabkan oleh senyawa kimia maupun obat-obatan (10). Limbah air rumah sakit kemudian akan disalurkan ke perairan dengan kontaminan di dalamnya seperti bakteri resisten antibiotik dan senyawa kimia yang kemudian dapat menjadi ancaman bagi kesehatan masyarakat dikarenakan adanya kemampuan penyebaran gen resisten antibiotik antara bakteri patogenik kepada bakteri oportunistik pada lingkungan (5).

Salah satu bakteri oportunistik yang banyak ditemukan pada lingkungan termasuk pada air dan tanah adalah *Pseudomonas aeruginosa* (11). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram *negative* yang berbentuk basil atau batang dengan ukuran 0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 μm , tersusun berpasangan. Bakteri ini bersifat obligat aerobik dan motil (12,13). Bakteri ini akan membentuk koloni yang tidak berwarna atau transparan pada media *CHROM agar CCA* dan bersifat *lactose fermenting* negatif pada media *MacConkey* sehingga membentuk koloni berwarna kuning pucat pada media ini (14).

Pseudomonas aeruginosa yang mengalami resistensi terhadap antibiotik maupun yang tidak mengalami resistensi terhadap antibiotik dapat tersebar pada lingkungan melalui limbah air rumah sakit dan dapat menyebabkan penyebaran gen resisten pada bakteri lainnya yang masih *susceptible* terhadap antibiotik sehingga menyebabkan bakteri pada lingkungan menjadi resisten terhadap antibiotik (5,15). Pada penelitian sebelumnya didapatkan bahwa konsentrasi *Pseudomonas aeruginosa* yang terdapat pada air di lingkungan mencapai $0,18 \times 10^6$ CFU/L dan pada limbah air rumah sakit memiliki konsentrasi yang lebih tinggi mencapai $4,46 \times 10^6$ (16). Sementara itu, penelitian lain menyatakan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* ditemukan telah mengalami resistensi terhadap berbagai macam antibiotik golongan fluoroquinolone, carbapenem, dan juga cephalosporin. Studi epidemiologis sebelumnya juga menguraikan bahwa tingkat resistensi *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik sebesar 12,9% dari total 700.000 kasus kematian yang disebabkan infeksi *Pseudomonas aeruginosa* di dunia (17). Penyebaran *Pseudomonas aeruginosa* pada lingkungan dapat menyebabkan beberapa masalah kesehatan seperti folikulitis, infeksi telinga yang disebabkan karena paparan air yang terkontaminasi, keratitis pada pasien yang menggunakan lensa kontak, infeksi saluran

kemih, endokarditis, dan bakteremia yang mampu mengancam nyawa (13,16).

Berdasarkan uraian tersebut, diperlukan penelitian untuk menganalisis sebaran profil bakteri dan profil resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada limbah air rumah sakit sebagai salah satu cara untuk mengurangi dan mencegah terjadinya infeksi yang disebabkan *Pseudomonas aeruginosa*. Disamping itu, penelitian ini juga ditujukan untuk mengetahui apakah limbah air rumah sakit yang dituju telah memenuhi standar pengolahan limbah air serta untuk menjaga kesehatan lingkungan di lingkungan rumah sakit dan di sekitar rumah sakit.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis studi eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *in vitro*. Penelitian dilakukan dengan melakukan kultur bakteri yang berasal dari sampel air dan dilakukan uji resistensi terhadap antibiotik melalui metode *Kirby-Bauer* (18). Sampel yang digunakan yaitu limbah air sebelum dan sesudah memasuki IPAL yang diperoleh dari salah satu rumah sakit tipe C yang terdapat di Malang. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Universitas Islam Malang (LPRK UNISMA). Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Maret hingga April 2024. Penelitian dilakukan setelah mendapat surat laik etik penelitian dengan nomor surat 12/KEPK/RSIU-U/II/2024.

Sampel dan Populasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah air rumah sakit yang diambil pada dua titik yaitu sebelum memasuki IPAL (*Ground Tank*) dan sesudah memasuki IPAL (Bak Indikator). Sementara populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari limbah air rumah sakit. Pengambilan sampel diulang sebanyak 6 kali.

Kultur Bakteri dari Sampel Limbah Air

Kultur bakteri dilakukan setelah mempersiapkan sampel dengan cara melakukan dilusi dengan *saline* steril. Kekuatan dilusi yang digunakan dalam persiapan kultur adalah 1x, 10x, dan 100x (19). Sampel yang telah dipersiapkan kemudian diinokulasi pada media spesifik berupa *CHROM agar Coliform Chromogenic Agar* (CCA) dalam cawan petri. Cawan petri kemudian diinkubasi dalam suhu

$36 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 18 – 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dianalisa berdasarkan warna koloni, dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan memunculkan koloni yang tidak berwarna, koloni bakteri *Escherichia coli* akan membentuk koloni berwarna biru, dan koloni *Enterobacter sp.* akan membentuk koloni berwarna merah (20).

Koloni yang didapat dari media *CHROM agar* kemudian diinokulasi kembali dalam media *MacConkey* yang merupakan media spesifik terhadap bakteri Gram negatif dan selektif berdasarkan kemampuan memfermentasikan laktosa. Inokulasi dilakukan dengan cara mengambil koloni yang tumbuh pada media *CHROM agar* CCA menggunakan ose dan diinokulasikan secara langsung pada media *MacConkey*. Media kemudian diinkubasi dalam suhu $36 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 18 – 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dianalisa berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi laktosa, sehingga dapat disimpulkan bahwa koloni yang tidak mampu memfermentasikan laktosa akan berwarna kuning pucat sementara bakteri yang mampu memfermentasikan laktosa akan berwarna merah (21). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa sehingga bakteri ini akan timbul dengan koloni yang berwarna kuning pucat, sementara bakteri *Escherichia coli* dan *Enterobacter sp.* akan membentuk koloni berwarna merah karena memiliki kemampuan memfermentasi laktosa (14).

Perhitungan Populasi yang Digunakan dalam Uji Sensitivitas Antibiotik

Populasi koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang akan digunakan dalam uji sensitivitas antibiotik dihitung menggunakan *Slovin Formula* sebagai berikut.

$$n = \frac{N}{1 + (N \times E^2)}$$

Huruf n mewakili jumlah koloni yang akan digunakan. Sementara huruf N mewakili populasi koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan dari media *CHROM agar* yang telah dinyatakan valid atau diterima (30 hingga 300 koloni), serta huruf E adalah tingkatan kesalahan atau *error rate* yang diperkirakan sebesar 20%. Sehingga setelah dilakukan perhitungan, didapatkan hasil bahwa koloni yang akan digunakan dalam kultur bakteri pada media *MacConkey* dan untuk uji sensitivitas antibiotik sebesar 25 koloni.

Perhitungan Perkiraan Koloni Bakteri pada Sampel Limbah Air

Perhitungan perkiraan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat pada sampel limbah air dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$n \text{ (CFU/ml)} = \frac{\text{Total Koloni}}{\text{Kekuatan Pengenceran} \times \text{Volume yang digunakan untuk Kultur}}$$

Uji Determinasi *Pseudomonas aeruginosa* Menggunakan Pewarnaan Gram

Object glass mula-mula dipanaskan diatas api bunsen. Setelah didinginkan dengan suhu ruang, *object glass* ditetaskan *saline* steril. Koloni yang didapatkan pada media *Mueller Hinton Agar* kemudian diambil menggunakan jarum ose yang sudah dipanaskan dan dicampurkan pada *saline* steril yang telah ditetaskan pada *object glass*. *Object glass* kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan pada ruangan. Setelah kering, *object glass* dipanaskan diatas api bunsen untuk difiksasi. Setelah itu, *object glass* ditetesi dengan reagen *Crystal violet* dan didiamkan selama 1 menit. *Object glass* kemudian dipanaskan diatas api bunsen, dan dialirkan aquades. Selanjutnya, *object glass* diberi tetesan reagen *Iodine* dan didiamkan selama 1 menit. *Object glass* kemudian kembali dibilas menggunakan aquades dan dilanjutkan dengan pemberian reagen *Safranin* dan didiamkan selama 30 detik. Setelah itu, *object glass* dialirkan aquades hingga warna yang didapat pada *object glass* hilang. Terakhir, *object glass* dikeringkan dan diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x menggunakan bantuan minyak emersi. Koloni bakteri Gram positif akan berwarna keunguan, sementara koloni bakteri Gram negatif akan berwarna kemerahan (22). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram *negative* yang berbentuk basil atau batang sehingga pada pengamatan akan didapatkan bakteri berbentuk batang yang berwarna merah (12,13).

Uji Sensitivitas Antibiotik *Pseudomonas aeruginosa*

Jumlah koloni bakteri yang akan digunakan dalam uji sensitivitas antibiotik mengikuti jumlah koloni yang ditumbuhkan pada media *MacConkey*, sejumlah 25 koloni. Koloni yang tumbuh pada media *MacConkey* diambil sebanyak 4 – 5 koloni untuk dilarutkan dalam *saline* steril dan membentuk inokulum. Inokulum yang terbentuk kemudian

distandarisasi menggunakan *Mc Farland Standard* sebelum dilakukan sub-kultur pada media *Mueller Hinton agar*. Setelah inokulum siap, dilakukan sub-kultur koloni pada media *Mueller Hinton agar* dengan cara meneteskan 100 µl inokulum pada cawan petri dan dilanjutkan dengan meletakkan cakram antibiotik yang berbeda pada masing-masing media. Sehingga cawan media yang dibutuhkan untuk melakukan uji sensitivitas antibiotik sebanyak 25 cawan. Antibiotik yang digunakan adalah Cefotaxime (30 µg), Gentamicin (10 µg), Meropenem (10 µg), dan Ciprofloxacin (5 µg). Peletakan cakram antibiotik dilakukan dengan memberi jarak sebesar 30 mm dan jumlah yang diletakkan dalam cawan petri mengikuti ukuran cawan petri (diameter cawan petri 90 mm maksimal 5 cakram; diameter cawan petri 150 mm maksimal 12 cakram) (18,23,24). Hasil interpretasi pada uji sensitivitas terdapat pada Tabel 1 (25).

Tabel 1 Standar Interpretasi Uji Sensitivitas Antibiotik

Jenis Antibiotik	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ceftazidime (30 µg)	≥ 18 mm	15 – 17 mm	≤ 14 mm
Gentamicin (10 µg)	≥ 15 mm	13 – 14 mm	≤ 12 mm
Meropenem (10 µg)	≥ 19 mm	16 – 18 mm	≤ 15 mm
Ciprofloxacin (5 µg)	≥ 25 mm	19 – 24 mm	≤ 18 mm

Perhitungan Efektivitas Eliminasi Bakteri pada Sistem Pengolahan Limbah Air Rumah Sakit

Efektivitas sistem IPAL dalam eliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diukur melalui rumus sebagai berikut (16).

$$\frac{\text{Rerata Bakteri Pre IPAL} - \text{Rerata Bakteri Post IPAL}}{\text{Rerata Bakteri Pre IPAL}} \times 100$$

Metode Analisa Data

Analisa data dilakukan menggunakan *IBM SPSS software for windows*. Data yang didapat dari hasil kultur bakteri akan dianalisa secara statistik menggunakan metode *Independent T Test* dengan membandingkan jumlah koloni yang didapat pada kedua sampel setelah syarat terpenuhi (uji normalitas dan homogenitas data ($p > 0.05$)). Disamping itu, data yang didapat dari hasil uji sensitivitas antibiotik akan dianalisa secara deskriptif pada masing-masing antibiotik.

HASIL DAN ANALISA DATA

Kultur dan Perhitungan Koloni Bakteri yang Didapat dari Sampel Limbah Air

Hasil kultur dan perhitungan koloni bakteri dilakukan berdasarkan jumlah koloni yang didapat pada media *CHROM agar* CCA, yang kemudian akan ditransformasikan dalam bentuk CFU/ml untuk memperkirakan jumlah koloni yang didapat dalam limbah air. Data yang didapat kemudian kembali ditransformasikan dalam bentuk Log_{10} untuk menganalisa perbedaan jumlah koloni bakteri dalam limbah secara lebih spesifik. Data yang didapatkan dianalisa menggunakan *Independent T Test* dengan hasil signifikansi (p) yang didapat sebesar 0,000. Hasil kultur ditunjukkan pada Gambar 1, sementara rerata perhitungan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan pada sampel limbah air pre-IPAL sebesar $\log 4.4440 \pm 0.20030$ atau setara dengan 2.7×10^4 CFU/ml dan pada sampel limbah air post-IPAL sebesar 2.9577 ± 0.06702 atau setara dengan 9.07×10^2 CFU/ml.

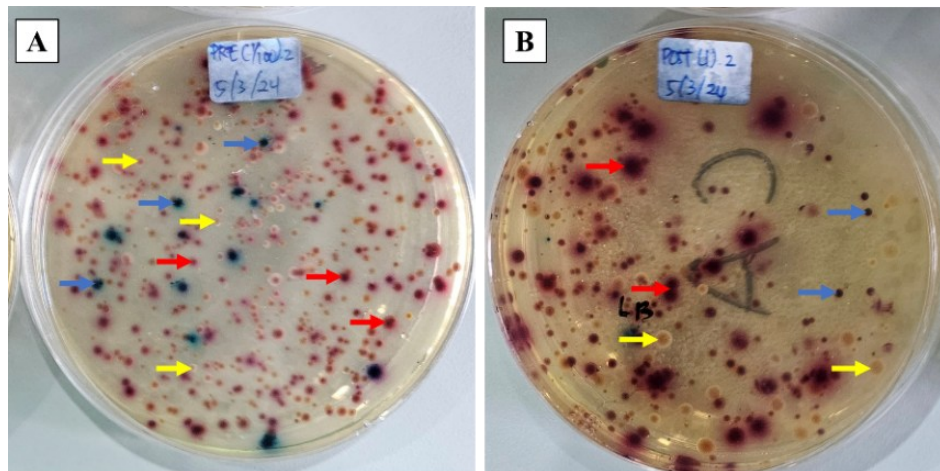
Uji Determinasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang Didapat dari Sampel Limbah Air

Koloni bakteri yang didapatkan pada media *CHROM* agar selanjutnya dianalisa

berdasarkan warna koloni yang terbentuk. Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan membentuk koloni yang tidak berwarna (Gambar 1). Koloni kemudian diinokulasikan pada media *MacConkey* untuk dilakukan determinasi ulang berdasarkan kemampuan bakteri dalam memfermentasikan laktosa. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang tidak mampu memfermentasikan laktosa, sehingga koloni yang terbentuk akan berwarna kuning pucat (Gambar 2). Terakhir, koloni yang didapatkan pada media *MacConkey* akan kembali diinokulasi pada media *Mueller Hinton Agar* untuk dilakukan peremajaan bakteri dan akan dilakukan pengecatan Gram untuk determinasi akhir. Pada pengecatan Gram, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan terlihat sebagai bakteri berbentuk batang atau *basil* berwarna merah yang tersusun berpasangan (Gambar 3).

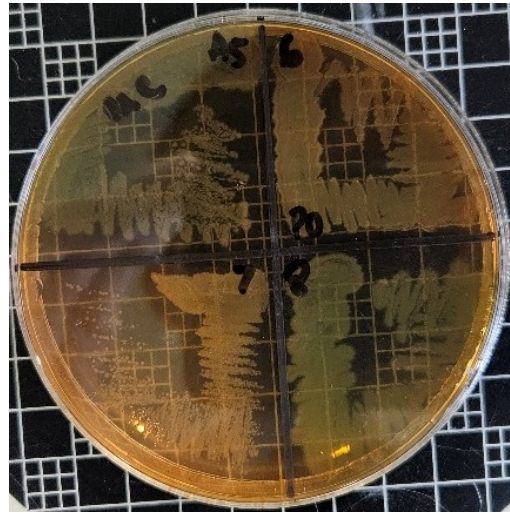
Uji Sensitivitas Antibiotik

Hasil uji sensitivitas antibiotik didasarkan terhadap luas zona inhibisi yang dinyatakan dalam milimeter (mm). Data yang didapatkan akan dianalisa secara deskriptif. Hasil uji ditunjukkan pada Gambar 4 dan Tabel 2.



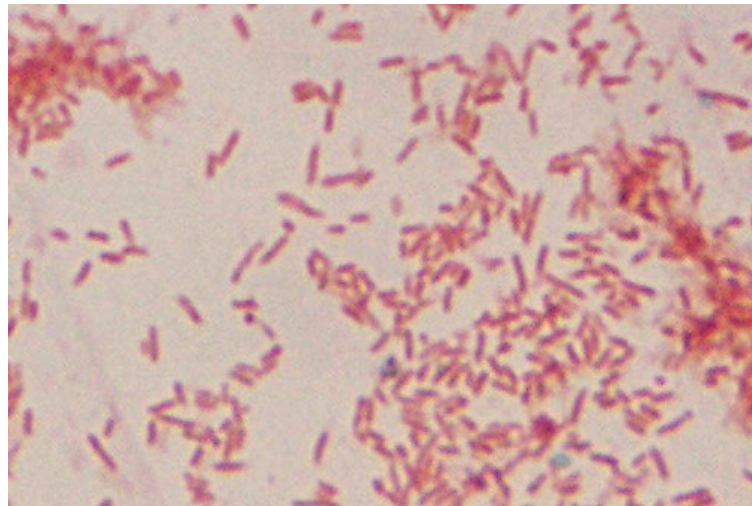
Gambar 1 Hasil kultur koloni bakteri pada media *CHROM* agar

Keterangan: Gambar A merupakan hasil kultur koloni bakteri pada sampel pre-IPAL; Gambar B merupakan hasil kultur koloni bakteri pada sampel post-IPAL; Panah berwarna merah menunjukkan koloni bakteri *Enterobacter sp.*; Panah berwarna biru menunjukkan koloni bakteri *Escherichia coli*; Panah berwarna kuning menunjukkan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.



Gambar 2 Hasil kultur pada media MacConkey

Keterangan: Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang membentuk koloni transparan pada media MacConkey



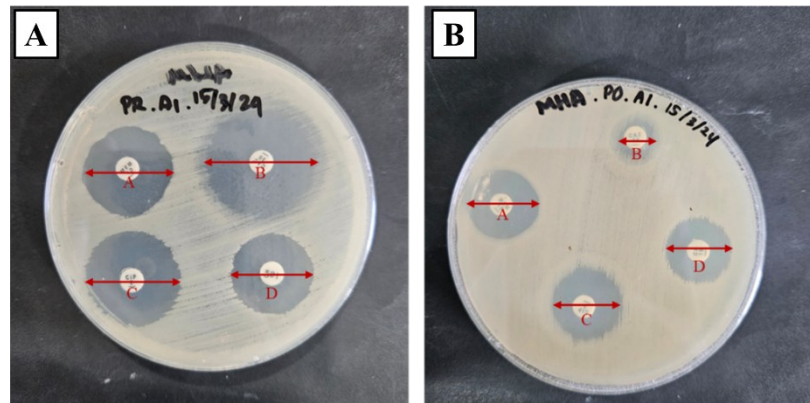
Gambar 3 Hasil determinasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Keterangan: Hasil uji diamati menggunakan perbesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi; determinasi menggunakan pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bakteri yang didapat dari koloni yang dikultur pada media kultur merupakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*; bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang berbentuk batang atau basil yang terwarna kemerahan pada pewarnaan Gram

Tabel 2 Hasil uji sensitivitas antibiotik bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotik	Sampel Pre-IPAL			Sampel Post-IPAL	
		Jumlah Sampel (n = 25 koloni)	Rerata Luas Zona Inhibisi (mm) ± SD	Jumlah Sampel (n = 25 koloni)	Rerata Luas Zona Inhibisi (mm) ± SD
Meropenem	S	25 (100%)	29,46 ± 4,67473	22 (88%)	28,86 ± 6,47668
	I	0 (0%)	-	2(8%)	17,45 ± 2,05061
	R	0 (0%)	-	1 (4%)	15
Ceftazidime	S	25 (100%)	27,3920 ± 5,17087	22 (88%)	25,0591 ± 4,45925
	I	0 (0%)	-	2 (8%)	16,00 ± 1.41421
	R	0 (0%)	-	1 (4%)	9.4
Ciprofloxacin	S	25 (100%)	33,5860 ± 3,75715	21 (84%)	32.3833 ± 5.18691
	I	0 (0%)	-	1 (4%)	19.4
	R	0 (0%)	-	3 (12%)	15.33 ± 1.15470
Gentamicin	S	24 (96%)	23,5458 ± 3,01532	25 (100%)	22.8980 ± 3.81637
	I	1 (4%)	14	0 (0%)	0
	R	0 (0%)	0	0 (0%)	0

Keterangan: S adalah *Susceptible*; I adalah *Intermediate*; R adalah *Resistant*.



Gambar 4 Hasil uji sensitivitas antibiotik

Keterangan:

*Gambar A merupakan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang *susceptible* terhadap antibiotik Meropenem (A) dengan diameter zona inhibisi 23.8 mm, Ceftazidime (B) dengan diameter zona inhibisi 28.3 mm, Ciprofloxacin (C) dengan diameter zona inhibisi 25.65 mm, dan Gentamicin (D) dengan diameter zona inhibisi 20.7 mm.

*Gambar B merupakan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang *intermediate* terhadap antibiotik Meropenem (A) dengan diameter zona inhibisi 18.9 mm, *resistant* terhadap Ceftazidime (B) dengan diameter zona inhibisi 9.4 mm, *intermediate* terhadap Ciprofloxacin (C) dengan diameter zona inhibisi 19.4 mm, dan *susceptible* terhadap Gentamicin (D) dengan diameter zona inhibisi 16.8 mm.

PEMBAHASAN

Sebaran Bakteri pada Saluran Pembuangan Air Limbah Rumah Sakit

Penelitian ini menemukan bahwa limbah air rumah sakit sebelum dan sesudah memasuki instalasi pengolahan air limbah (IPAL) yang diteliti mengandung bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Enterobacter sp.* (26,27). Rerata bakteri *Escherichia coli* yang didapatkan pada sampel limbah air sebelum memasuki IPAL sebesar 1.3×10^4 CFU/ml dan menjadi 3.8×10^1 CFU/ml pada sampel limbah air yang telah memasuki IPAL (26). Sementara rerata bakteri *Enterobacter sp.* yang didapat pada sampel limbah air yang belum memasuki IPAL sebesar 2.3×10^5 CFU/ml dan menjadi 1.4×10^3 CFU/ml pada sampel limbah air yang telah memasuki IPAL (27). Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, dimana beberapa bakteri Gram negatif yang banyak ditemukan pada limbah air rumah sakit adalah *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Leptospira*, dan bakteri coliform seperti *Enterobacter*, *Klebsiella*, dan *Escherichia coli* (7). Namun, penelitian ini tidak meneliti terkait sebaran bakteri Gram positif sehingga hal tersebut menjadi kelemahan dari penelitian ini.

Penyebab utama adanya bakteri pada limbah air yang telah memasuki IPAL adalah ketidakefektifan dari sistem IPAL tersebut. Efektivitas IPAL dalam mengeliminasi bakteri

utamanya terjadi pada pengolahan sekunder dan proses disinfeksi, dimana pengolahan sekunder yang digunakan dalam sistem IPAL yang diteliti adalah *Activated Sludge Process* (ASP) serta proses disinfeksi menggunakan klorin. Proses disinfeksi merupakan proses akhir yang diharapkan mampu untuk menghilangkan seluruh mikroorganisme pada limbah air. Pada proses ini, klorin merupakan senyawa yang paling banyak digunakan di seluruh dunia. Dalam penggunaannya, klorin memerlukan pengawasan dosis yang tepat dikarenakan adanya risiko terjadinya resistensi terhadap klorin sehingga bakteri dapat bertahan dalam proses disinfeksi dan dapat menyebar hingga sistem pengolahan limbah air umum (28). Pada penelitian sebelumnya, dinyatakan bahwa ASP tidak dapat menghilangkan patogen seperti bakteri sepenuhnya, sementara proses disinfeksi dinyatakan tidak cukup kuat dalam mengeliminasi patogen apabila tidak dikombinasikan dengan pengolahan tersier seperti penggunaan proses ozonasi atau radiasi (29).

Profil Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada Saluran Pembuangan Air Limbah Rumah Sakit

Pada penelitian ini ditemukan bahwa limbah air yang didapat pada salah satu rumah sakit tipe C mengandung bakteri Gram negatif yang berbentuk basil atau batang yang kemudian diidentifikasi sebagai bakteri *Pseudomonas aeruginosa* melalui pewarnaan

Gram (Gambar 1). Disamping itu, konfirmasi bakteri juga dilakukan sebelumnya menggunakan media *CHROM agar Chromogenic Coliform Agar* (CCA), dimana bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan membentuk koloni yang tidak memiliki warna atau transparan hingga berwarna kekuningan.

Hasil perhitungan koloni yang didapat pada penelitian ini menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan, dengan rata-rata koloni yang didapatkan pada limbah air pre-IPAL dalam bentuk $\log_{10}$ adalah 4.4440 ± 0.20030 ($p = 0.000$), atau setara dengan 2.7×10^4 CFU/ml, sementara rata-rata koloni yang didapatkan pada limbah air post-IPAL dalam bentuk $\log_{10}$ adalah 2.9577 ± 0.06702 ($p = 0.000$), atau setara dengan 9.07×10^2 CFU/ml. Adanya koloni yang didapat pada sampel limbah air yang telah memasuki sistem instalasi pengolahan air limbah (IPAL) mengindikasikan adanya ketidakefektifan sistem IPAL dalam mengeliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil yang didapat pada penelitian ini menunjukkan bahwa limbah air yang dikeluarkan belum memenuhi standar kadar bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diperbolehkan dalam air, dimana kadar maksimal yang diperbolehkan sebesar 1×10^{-2} CFU/ml, sehingga keberadaan bakteri tersebut dapat menjadi salah satu ancaman bagi kesehatan lingkungan (30).

Berdasarkan hasil koloni yang didapatkan pada penelitian, dapat juga dilakukan pengukuran terhadap efektivitas sistem IPAL dalam mengeliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Didapatkan hasil bahwa sistem IPAL rumah sakit tersebut memiliki efektivitas eliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 96.64%. Hasil perhitungan efektivitas sistem IPAL dalam eliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ini lebih tinggi daripada penelitian sebelumnya, dimana pada penelitian sebelumnya efektivitas eliminasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mencapai 94% (16). *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa standar eliminasi bakteri pada limbah air rumah sakit setidaknya sebesar 95%, sehingga rumah sakit yang menjadi penyedia sampel telah memenuhi standar yang diatur oleh WHO (31).

Profil Sensitivitas Antibiotik Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Pada penelitian ini, uji sensitivitas antibiotik dilakukan menggunakan metode *Kirby-bauer* yang mengukur dan membagi tingkat sensitivitas terhadap antibiotik berdasarkan luas

zona inhibisi. Penelitian ini menguji sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik Meropenem, Ceftazidime, Ciprofloxacin, dan Gentamicin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari total koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang diujikan ($n = 25$ koloni), antibiotik yang paling sensitif hingga yang kurang sensitif adalah Gentamicin, Meropenem, Ceftazidime, dan terakhir adalah Ciprofloxacin.

Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari sampel limbah air post-IPAL ($n = 25$) menunjukkan adanya perubahan pada tingkat sensitivitas antibiotik dengan hasil menunjukkan bahwa 88% bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 22$) *sensitive* terhadap antibiotik Meropenem dan Ceftazidime, 8% ($n = 2$) mengalami peningkatan sensitivitas (*intermediate*), dan 4% ($n = 1$) bakteri mengalami resistensi terhadap antibiotik Meropenem dan Ceftazidime. Disamping itu, 48% bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 21$) *sensitive* terhadap antibiotik Ciprofloxacin, 4% ($n = 1$) mengalami peningkatan sensitivitas (*intermediate*), dan 12% ($n = 3$) bakteri mengalami resistensi terhadap antibiotik Ciprofloxacin. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mengalami perubahan tingkat sensitivitas terhadap antibiotik selama bakteri memasuki sistem pengolahan limbah air rumah sakit. Hasil yang didapat pada penelitian ini berbanding terbalik dengan penelitian sebelumnya yang mendapatkan tingkat resistensi yang tinggi terhadap antibiotik tersebut pada sampel yang diperoleh dari sungai yang menjadi saluran pembuangan limbah air yang sudah memasuki IPAL (15). Penelitian lain menyatakan bahwa dari total *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat pada limbah air rumah sakit ($n = 5$), terdapat 40% koloni yang resisten terhadap Ceftazidime, 60% koloni resisten terhadap Meropenem, 60% koloni resisten terhadap Ciprofloxacin, dan 80% koloni resisten terhadap Gentamicin (4), dimana hal ini juga berbanding terbalik dengan hasil yang didapatkan pada penelitian ini.

Resistensi yang terjadi pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat terjadi karena faktor internal maupun eksternal. Beberapa faktor eksternal yang memengaruhi timbulnya resistensi terhadap antibiotik adalah senyawa mikropolutan dan karbon yang terdapat pada limbah air sehingga bakteri mengalami adaptasi berupa mengaktifkan respon stres (32). Disamping itu, faktor ekstrinsik lain yang memengaruhi pembentukan resistensi terhadap antibiotik adalah adanya antibiotik dan obat-

obatan (33). Dalam merespon stres yang diinduksi lingkungan, bakteri akan beradaptasi melalui pembentukan mekanisme proteksi yang diatur melalui beberapa tingkatan mulai dari tingkat transkripsi, translasi, dan *post-translasi*, menyebabkan terjadinya perubahan ekspresi genetik, aktivitas protein, dan metabolisme seluler sehingga terbentuk resistensi terhadap antibiotik (34). Disamping itu, tingginya kadar antibiotik dalam limbah air rumah sakit dapat menginduksi terjadinya resistensi antibiotik pada bakteri melalui *antibiotic selective pressure*, dimana bakteri akan terinduksi resistensinya terhadap antibiotik dan bakteri yang tidak terinduksi akan mengalami kematian (35). Adanya sistem IPAL yang tidak efektif dapat mengakibatkan senyawa-senyawa dalam limbah air tidak tereliminasi sehingga akan menginduksi terjadinya resistensi terhadap antibiotik pada bakteri walaupun sudah memasuki sistem IPAL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat bakteri Gram negatif berupa *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Enterobacter sp.* pada limbah air sebelum dan sesudah memasuki IPAL. Bakteri Gram negatif yang diidentifikasi secara spesifik pada penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Jumlah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat pada limbah air yang telah memasuki IPAL lebih rendah daripada limbah air yang belum memasuki IPAL, namun jumlah yang didapatkan masih berada diatas batas yang telah ditetapkan. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan pada penelitian ini lebih sensitif terhadap antibiotik Gentamicin dan cenderung kurang sensitif atau resisten terhadap Ciprofloxacin.

SARAN

Penelitian ini memiliki kekurangan berupa hanya menganalisa bakteri Gram negatif dan tidak menganalisa bakteri Gram positif, sehingga diharapkan pada penelitian selanjutnya analisa bakteri pada limbah air rumah sakit meneliti bakteri Gram negatif dan positif. Disamping itu, peneliti menyarankan adanya perbaikan dan/atau penambahan prosedur dalam sistem instalasi pembuangan air limbah (IPAL) sehingga dapat meningkatkan efektivitas IPAL dalam mengeliminasi bakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih saya sampaikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah memberikan saya kesempatan untuk melakukan penelitian ini. Disamping itu, saya menyampaikan terimakasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah memberikan pendanaan terhadap penelitian ini dan kepada Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M. Kes yang telah menjadi *reviewer* dalam penyusunan dan penulisan jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Asfaw T. Review on hospital wastewater as a source of emerging drug resistance pathogens. *J Res Environ Sci Toxicol*. 2018;7(2):47–52.
2. Khan MT, Shah IA, Ihsanullah I, Naushad M, Ali S, Shah SHA, et al. Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. *J Water Process Eng [Internet]*. 2021;41(March):101990. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101990>
3. Frascaroli G, Reid D, Hunter C, Roberts J, Helwig K, Spencer J, et al. Pharmaceuticals in wastewater treatment plants: A systematic review on the substances of greatest concern responsible for the development of antimicrobial resistance. *Appl Sci*. 2021;11(15).
4. Irfan M, Almotiri A, AlZeyadi ZA. Antimicrobial Resistance and β -Lactamase Production in Clinically Significant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital and Municipal Wastewater. Vol. 12, *Antibiotics*. 2023.
5. Roulová N, Mot'ková P, Brožková I, Pejchalová M. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *J Water Health*. 2022;20(4):692–701.
6. Kementerian Lingkungan Hidup Republik Indonesia. Peraturan Menteri

- Lingkungan Hidup Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2014. In 2014.
7. Asfaw T, Negash L, Kahsay A, Weldu Y. Antibiotic Resistant Bacteria from Treated and Untreated Hospital Wastewater at Ayder Referral Hospital, Mekelle, North Ethiopia. *Adv Microbiol*. 2017;07(12):871–86.
 8. Velazquez-Meza ME, Galarde-López M, Cornejo-Juárez P, Carrillo-Quiroz BA, Velázquez-Acosta C, Bobadilla-del-Valle M, et al. Multidrug-Resistant *Staphylococcus* sp. and *Enterococcus* sp. in Municipal and Hospital Wastewater: A Longitudinal Study. *Microorganisms*. 2024;12(4):645.
 9. Davidova-Gerzova L, Lausova J, Sukkar I, Nesporova K, Nechutna L, Vlkova K, et al. Hospital and community wastewater as a source of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13(May):1–11.
 10. Mackull'ak T, Cverenkárová K, Stanová A, Fehér M, Tamás M, Škulcová A, et al. Hospital Wastewater — Source of Specific Micropollutants ,. *Antibiotics*. 2021;10(10):1–14.
 11. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens* [Internet]. 18 Desember 2021;10(12):1638. Tersedia pada: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/12/1638>
 12. Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S, Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. McGraw Hill Education; 2016. 867 hal.
 13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 9th ed. Washington DC: Elsevier Publishing; 2021.
 14. Shaker NS, Al-musawi MT. Assessment of the prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* among Iraqi patients with acne and study of their antibiotic susceptibility patterns. *Int J Health Sci* (Qassim). 2022;6(April):3031–9.
 15. Magalhães MJTL, Pontes G, Serra PT, Balieiro A, Castro D, Pieri FA, et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0798-0>
 16. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, et al. Tracking Down Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Wastewater Network. *PLoS One*. 2012;7(12).
 17. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 25 Juni 2022;7(1):199. Tersedia pada: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01056-1>
 18. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *Am Soc Microbiol* [Internet]. 2012;(December 2009):1–13. Tersedia pada: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
 19. Reynolds J. Serial Dilution Protocols. *Am Soc Microbiol* [Internet]. 2005;(September 2005):1–7. Tersedia pada: www.asmscience.org
 20. American Type Culture Collection. Instructions For Use CHROMagar CCA. 2022.
 21. Allen ME. MacConkey Agar Plates Protocols. *ASM microbelibrary* [Internet]. 2013;(September 2005):1. Tersedia pada: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2855-macconkey-agar-plates-protocols>

22. Smith A, Hussey M. Gram Stain Protocols. <i>American Soc Microbiol [Internet]. 2016;(September 2020):1–9. Tersedia pada: www.asmscience.org
23. Schwalbe R, Moore LS, Goodwin AC. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols [Internet]. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC, editor. CRC Press; 2007. Tersedia pada: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420014495>
24. Jain A, Jain R, Jain S. Sterility Testing of Pharmaceuticals. In: Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. 2020.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. Vol. 8, Journal of Services Marketing. 2023.
26. Wahyudi LA, Putri CDR, Airlangga RMH. Sebaran Profil Bakteri *Escherichia coli* dan Profil Resistensi Antibiotiknya pada Saluran Pembuangan Limbah Air di Rumah Sakit Islam Universitas Islam Malang. 2024;
27. Wasistha WB, Putri CDR, Airlangga RMH. Sebaran Profil Bakteri *Enterobacter* sp. dan Profil Resistensi Antibiotiknya pada Saluran Pembuangan Limbah Air di Rumah Sakit Islam Universitas Islam Malang. 2024;
28. Yao S, Ye J, Yang Q, Hu Y, Zhang T, Jiang L, et al. Occurrence and removal of antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial communities in hospital wastewater. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28(40):57321–33.
29. Yuan T, Pian Y. Hospital wastewater as hotspots for pathogenic microorganisms spread into aquatic environment: A review. *Front Environ Sci*. 2023;10(January):1–10.
30. Kementerian Kesehatan. Permenkes No. 2 Tahun 2023. 2023;
31. Yan S, Tyagi RD, Drogui P, Zhang XL. Guidelines for hospital wastewater discharge [Internet]. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Environmental and Health Impact of Hospital Wastewater. BV; 2020. 571–597 hal. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-819722-6.00016-X>
32. Izabel-Shen D, Li S, Luo T, Wang J, Li Y, Sun Q, et al. Repeated introduction of micropollutants enhances microbial succession despite stable degradation patterns. *ISME Commun*. 2022;2(1).
33. Kaur R, Yadav B, Tyagi RD. Microbiology of hospital wastewater. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering [Internet]. Elsevier; 2020. hal. 103–48. Tersedia pada: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128197226000043>
34. Dawan J, Ahn J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms*. 2022;10(7).
35. Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect*. 2012;120(8):1100–6.