

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian observasional laboratorik untuk mengetahui pertumbuhan mikroorganisme pengganti Air Susu Ibu di Unit Perinatologi Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung dengan menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN).

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Pengambilan sampel dilakukan di Unit Perinatologi Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung dan identifikasi mikroorganisme dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Bandar Lampung, pada bulan bulan Desember 2012-Januari 2013.

### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi penelitian adalah PASI di Unit perinatologi Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung. Sampel penelitian diambil dengan menggunakan accidental sampling dengan jumlah sampel 16 dengan pengambilan 2 minggu.

### **D. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian adalah PASI yang akan diberikan kepada bayi, diperoleh dari Unit perinatologi Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung. PASI yang digunakan dalam penelitian adalah susu formula dalam bentuk bubuk yang dicampurkan air yang berasal dari air minum isi ulang.

### **E. Alat-Alat Penelitian**

Alat-alat yang dipakai adalah alat-alat yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi, seperti lemari pengeram (*incubator*), rak dan tabung reaksi, tabung durham, gelas beker, pipet ukur, cawan petri, kapas steril, bunsen, ose serta peralatan lain yang lazim digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

## **F. Media yang Digunakan**

1. *Lactose Broth Single Strength*
2. *Brilliant Green Lactose Bile Broth*
3. *Eosin Metilen Blue*
4. Media gula-gula: glukosa, laktosa, manitol, maltose, sukrosa
5. Agar SIM
6. Agar Sitrat

## **G. Prosedur Penelitian**

### 1. Persiapan Spesimen

PASI dan air diperoleh dari Unit perinatologi Rumah Sakit Abdul Moeloek Bandar Lampung dengan menggunakan tabung dan botol kecil yang sudah disterilkan terlebih dahulu sebanyak 5 ml.

### 2. Prosedur Penelitian

#### a. Uji kualitas PASI dan air dengan menggunakan metode MPN

##### a) Uji Penduga (Presumptive Test)

Spesimen cair ditanam pada:

- 1) Tiga tabung *Lactose Broth Single Strength* (10 ml) masing-masing 1 ml

2) Tiga tabung *Lactose Broth Single Strenght* (10 ml) masing-masing 0,1 ml

3) Tiga tabung *Lactose Broth Single Strenght* (10 ml) masing-masing 0,01 ml.

Tabung-tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 48 jam. Tabung-tabung yang menghasilkan gas dilanjutkan dengan uji penegasan.

b) Uji Penegasan (Confirmed Test)

1) Dari tabung-tabung *Lactose Broth* pada uji penduga yang menghasilkan gas diambil sedikit dengan mencelupkan ose ke dalamnya kemudian dicelupkan kembali ke dalam tabung *Brilliant Green Lactose Bille Broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 48 jam.

2) Tabung-tabung yang menghasilkan gas dicatat dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah terdekat bakteri koliform yang terkandung di dalam sampel.

c. Uji Kelengkapan (Completed Test)

1) Tabung *Brilliant Green Lactose Broth* yang menghasilkan gas dicelupkan dengan ose setipis mungkin, kemudian ditanam pada agar EMB dan diinkubasi dalam inkubator 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

2) Koloni yang terbentuk dilakukan dengan uji biokimia. Ose digoreskan pada koloni yang terbentuk kemudian ditanam pada tabung-tabung uji biokimia (glukosa, laktosa, manitol, maltose, sukrosa, SIM, agar sitrat). Tabung-tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

b. Identifikasi bakteri

a) Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah pewarnaan yang sering dilakukan untuk identifikasi bakteri awal dari spesimen karena dengan pewarnaan ini akan dapat dilihat bentuk dan warna dari bakteri yang ada. Setelah didapatkan sampel maka dilakukan pewarnaan gram. Buat hapusan diatas kaca objek kemudian difiksasi diatas nyala api, kemudian letakkan sediaan diatas rak pewarnaan. Setelah itu tuang larutan kristal violet diatas sediaan diamkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, tuangi dengan larutan lugol, diamkan selama 1 menit kemudian larutan tersebut dibuang, beri larutan alkohol 95% selama 15 detik. Cuci dengan air lalu tuangi sediaan dengan larutan safranin sebanyak 1 tetes diamkan selama 30 detik. Setelah itu, cuci dengan air dan keringkan diudara, lihat dibawah mikroskop dengan menggunakan pembesaran 100x.

b) Uji biokimia untuk bakteri gram negatif

1) Uji Gula-Gula

Dengan menggunakan ose steril, diambil biakan bakteri, kemudian ditanam pada media Glukosa, Sukrosa, Laktosa, Maltosa dan Manitol dengan cara mengaduk dengan ose secara perlahan-lahan dipermukaan tabung. Lalu dihomogenkan. Diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat. Jika pada uji gula-gula hanya terjadi perubahan warna pada media glukosa yang berubah menjadi warna kuning, artinya bakteri ini membentuk asam dari fermentasi glukosa. Jika pada media glukosa juga terbentuk gelembung pada tabung durham yang diletakan terbalik didalam tabung media, artinya hasil fermentasi berbentuk gas.

2) Uji TSIA

Dengan menggunakan ose steril, tanam spesimen pada media TSIA dengan cara menusuk ose sampai sepertiga dasar tabung. Kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada permukaannya. Diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Media ini biasanya digunakan untuk membedakan *Salmonella* dan *Shigella* dengan bakteri Gram negatif bentuk batang lainnya bedasarkan pola fermentasi penghasil hidrogen sulfide.

### 3) Uji Sitrat

Dengan menggunakan ose steril, tanam pada media Simmon's citrat dengan cara digores secara zig zag pada permukaannya. Diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Jika hasilnya ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna hijau menjadi biru, artinya bakteri ini tidak mempunyai enzim sitrat permiase yaitu enzim spesifik yang membawa sitrat ke dalam sel.

### c) Uji biokimia untuk bakteri gram positif

#### 1) Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan cairan  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada koloni yang diambil sebanyak satu ose dan dipindahkan ke atas kaca objek. 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 SIM

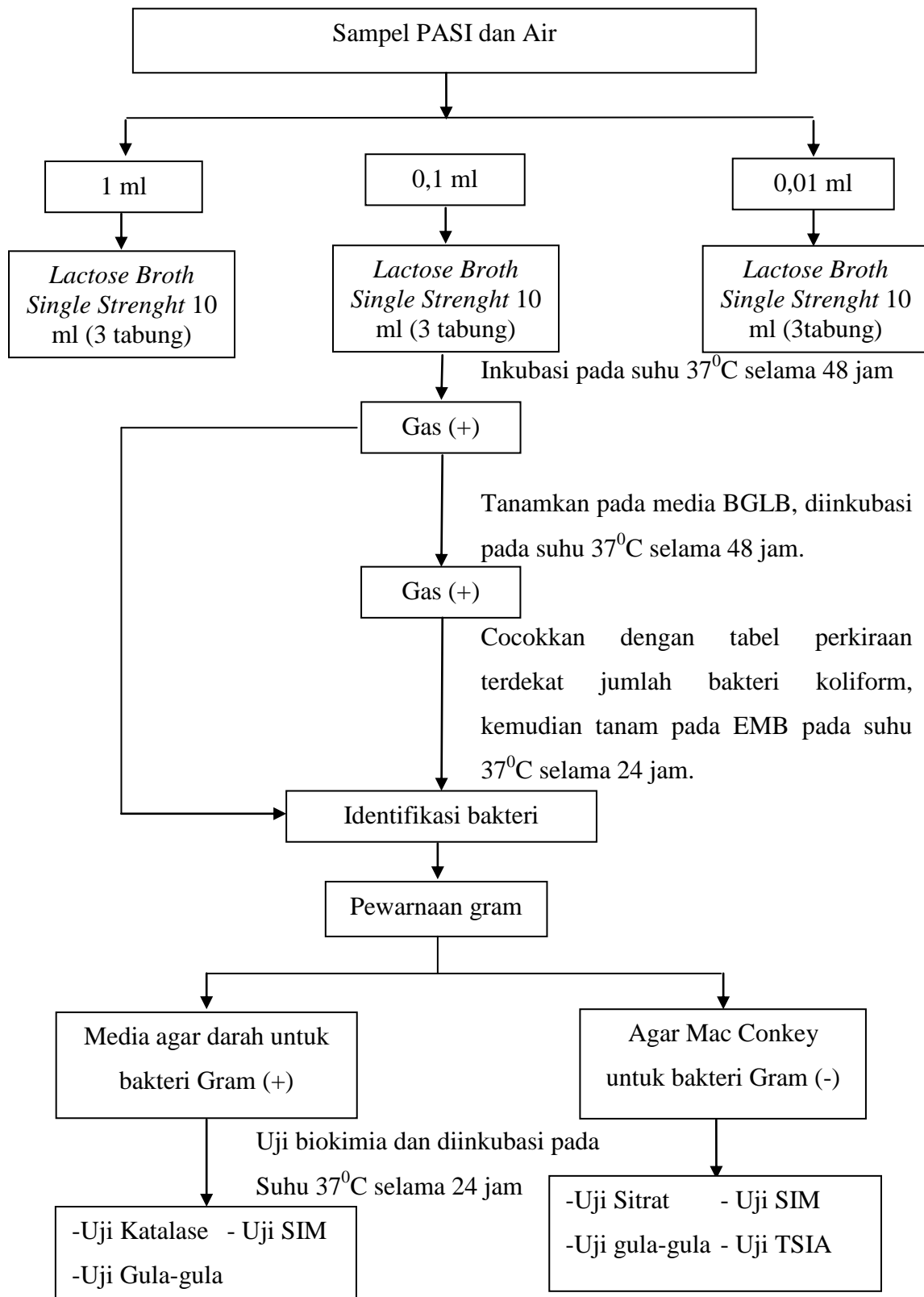
Dengan menggunakan ose steril, tanam pada media SIM dengan cara menusuk ose tegak lurus. Inkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Jika terlihat adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi maka menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Jika dari uji juga terlihat ada warna hitam, maka menandakan bakteri ini menghasilkan Hidrogen Sulfit ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

### 3. Penyajian Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.



## H. Alur Penelitian



## I. Identifikasi Variabel

Terdapat dua variabel yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah pertumbuhan mikroorganisme.
2. Variabel bebas (*independent variable*) adalah PASI.

## J. Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Hasil	Kriteria Hasil	Skala
Pertumbuhan mikroorganisme	Penambahan panjang, diameter, luas, jumlah sel volume, komponen, dan dari segi metabolisme.	a. Ya b. Tidak	Terdapat pertumbuhan mikroorganisme Tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme	Ordinal
Kualitas PASI	Kualitas PASI yang diketahui dengan menggunakan metode MPN	a. Baik b. Buruk	Kandungan bakteri koliform 0/100 ml sampel Kandungan bakteri koliform >0/100 ml sampel	Ordinal