

### **III. METODELOGI PENELITIAN**

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

Desain penelitian ini adalah penelitian deskriptif laboratorik dengan melakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis untuk mengetahui pola mikroorganisme penyebab infeksi pada luka post operasidengan di ruang Rawat Inap Bedah dan Kebidanan RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung.

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

Pengambilan sampel dilakukan pada pasien 72 jam post operasi di ruang Rawat Inap Bedah dan Kebidanan RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung. Penelitian mikrobiologi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Oktober 2011-Januari 2012.

### C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah seluruh pasien yang telah mendapat tindakan operasi dan masih mendapat perawatan di ruang Rawat Inap Bedah dan Kebidanan RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung.

Sampel penelitian didapat dengan menggunakan perhitungan :

$$n = z \left[ \frac{Z \alpha S}{d} \right]^2$$

Keterangan :  $n$  = jumlah sampel

$Z$  = Derivat baku normal berdasarkan tabel untuk taraf kepercayaan tertentu (95-98%).

$S$  = Simpang baku rerata (standar deviasi) dalam populasi  
(5-6)

$d$  = Tingkat ketepatan absolut

(Sastroasmoro, 2000).

Sehingga jumlah sampel yang di butuhkan

$$n = 2 \left[ \frac{1,96 \times 5,5}{2} \right]^2$$

$n = 58,10$  dibulatkan menjadi 60 sampel

Berdasarkan rumus, jumlah sampel yang cukup representatif lebih kurang 60 orang, diambil spesimen dari luka post operasi.

1. Kriteria Inklusi

Pasien yang telah mendapat tindakan pembedahan dan dirawat lebih dari 72 jam dan memiliki tanda-tanda infeksi pada luka.

2. Kriteria Eksklusi

Pasien yang telah mendapat tindakan pembedahan dan dirawat lebih dari 72 jam tanpa adanya tanda infeksi pada luka.

#### **D. Alat-alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet, alat inokulasi (ose), spiritus, kaca objek, mikroskop cahaya, inkubator 37<sup>0</sup> C, oven, autoklaf.

2. Bahan yang digunakan adalah

Lempeng Agar Darah, *MacConkey* Agar, Nutrient Agar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCL, Kovacs, plasma manusia, NaCl, SIM (Sulfur, Indol, Motiliti) Agar, Urea agar base, spirtus, Simmon Citrate Agar, TSIA (Triple Sugar Iron Agar), Gentian Violet, Lugol, alkohol 70%, safranin, air suling, glukosa, maltosa, manitol, sukrosa, laktosa.

## E. Defenisi Operasional

**Tabel 1 . Definisi Operasional**

<b>Variabel</b>	<b>Definisi</b>	<b>Alat Ukur</b>	<b>Hasil Ukur</b>	<b>Skala</b>
Jenis Bakteri	Bakteri yang dapat ditemukan pada luka post operasi yang terinfeksi saat dirawat 72 jam atau lebih di rumah sakit	Media Kultur Pewarnaan Gram Uji biokimia	Persentase bakteri Gram positif dan negatif yang teridentifikasi	nominal

## F. Alur Penelitian

### 1. Pengambilan spesimen luka post operasi

Sebelum sampel diambil dengan menggunakan cottonbud steril, dilakukan informed consent kepada pasien tersebut apakah bersedia untuk menjadi sampel dari penelitian. Setelah swab luka diambil spesimen tersebut dipindahkan ke dalam media nutrient agar miring dan diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## 2. Isolasi Bakteri

Hasil swab luka yang diambil dengan cottonbud steril ditanam pada nutrient agar miring dengan digores secara merata pada agar. Agar dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam.

## 3. Pewarnaan Gram

Prosedur dalam melakukan pewarnaan Gram, sebagai berikut :

1. Kaca objek dibersihkan sehingga bebas dari lemak dan kotoran, dengan cara membakar kaca objek di atas api kemudian diberi tanda.
2. Koloni dioleskan seluas garis tanda dengan menggunakan ose, lalu ditambahkan NaCl sampai membentuk suspensi.
3. Suspensi tersebut dikeringkan dengan cara menghangatkan jauh di atas api.
4. Dilakukan fiksasi di atas api kecil tiga kali berturut-turut selama satu detik agar organisme mati dan menempel lekat pada kaca objek.
5. Kaca objek didinginkan.
6. Sediaan apus dituangi dengan Kristal Violet, lalu dibiarkan selama 60 detik.
7. Kristal Violet dibuang, lalu dibilas dengan air mengalir kemudian segera diberikan larutan lugol dan dibiarkan selama 60 detik.
8. Lugol dibuang lalu sediaan dicuci dengan alkohol 96 % sampai tidak ada zat warna yang terlarut.
9. Sediaan dibilas dengan air sampai bersih.
10. Larutan safranin dituangkan dan dibiarkan selama 30 detik.

11. Sediaan dicuci dengan air mengalir sampai bersih.
12. Sediaan dikeringkan dengan kertas saring.
13. Hasil pewarnaan diperiksa dengan memakai mikroskop menggunakan perbesaran lensa objektif 100x, dengan bantuan minyak emersi (Steven, 2004).

Setelah dilakukan pewarnaan Gram dilanjutkan dengan pembiakan menggunakan lempeng agar darah untuk gram positif dan lempeng agar Mac Conkey untuk bakteri Gram negative.

#### **4. Uji Biokimiawi**

- **Untuk bakteri Gram Positif :**

- 1) Tes katalase

Untuk membedakan *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp* digunakan tes katalase yaitu dengan cara meneteskan cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, 2004).

- 2) Tes DNase

Kultur bakteri ditanam pada DNase agar plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam. Koloni yang tumbuh digenangi dengan HCl 10% selama 1-2 menit. Hasil positif apabila ada zone bening disekitar koloni

yang menandakan *Staphylococcus aureus* dan negative apabila tidak ada zone bening sekitar koloni yang menandakan spesies *Staphylococcus sp* yang lain (Soemarno, 2003).

### 3) Uji Fermentasi Glukosa

Dengan menggunakan ose bulat, bakteri diambil kemudian dimasukkan ke dalam larutan glukosa 5 ml lalu diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi hijau atau kuning yang menandakan *Staphylococcus epidermidis* dan hasil negatif apabila larutan glukosa tetap berwarna biru yang menandakan *Staphylococcus saprophyticus* (Soemarno, 2003).

#### • Untuk Bakteri Gram Negatif :

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

Agar TSIA untuk menilai kemampuan bakteri memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hal ini ditandai dengan perubahan warna akibat timbulnya suasana asam, serta terbentuknya H<sub>2</sub>S yang ditandai dengan perubahan warna media dari orange menjadi hitam, karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>+2</sup> yang terdapat pada media yang menghasilkan endapan hitam. Hasil fermentasi diamati pada 2 tempat, yaitu bagian miring dan bagian dasar (Steven, 2004).

## 2) Uji Sulfur Indole Motility (SIM)

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

## 3) Uji Sitrat

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

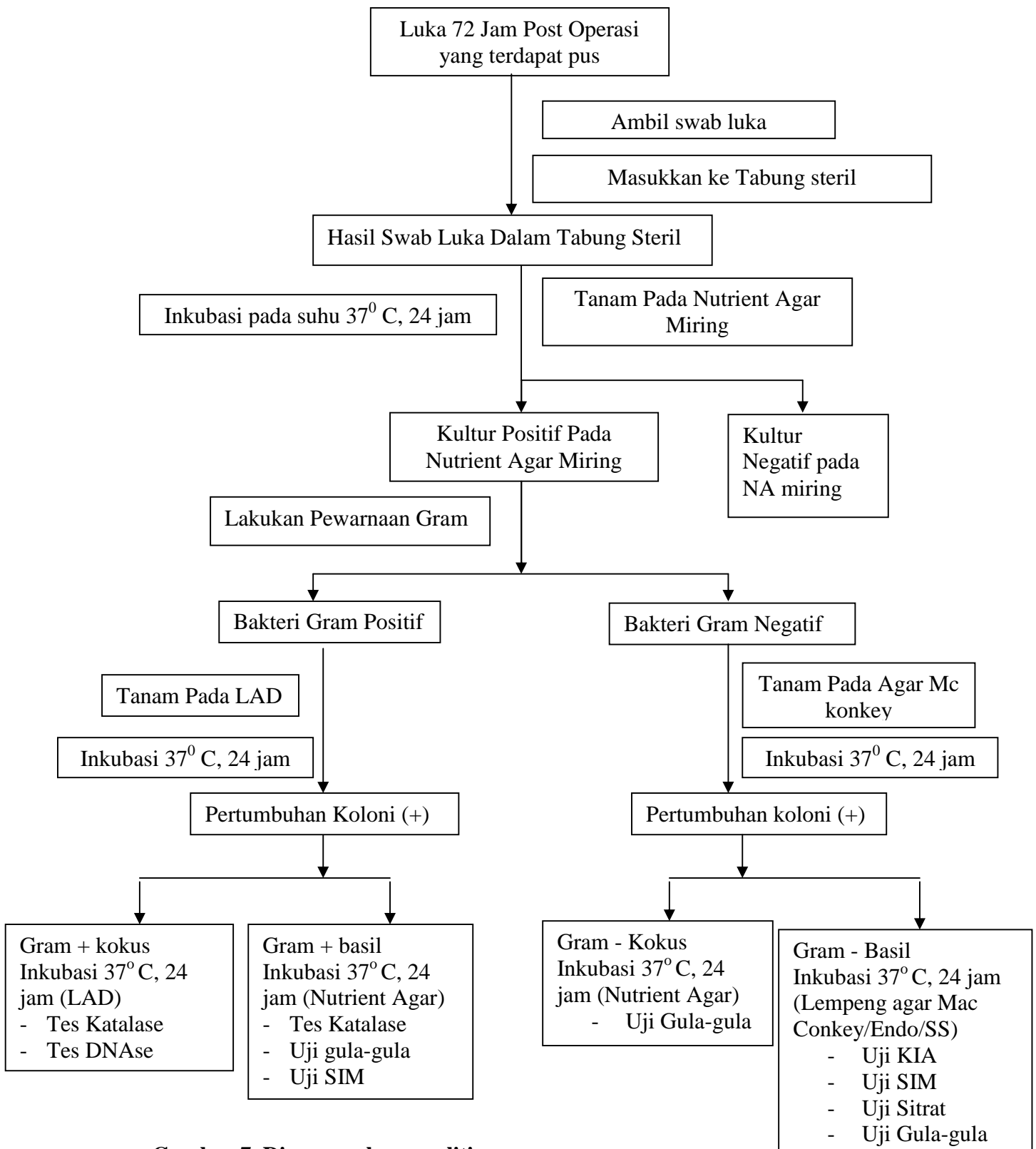
## 4) Uji gula-gula

Larutan gula yang dipakai adalah glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Uji ini didasarkan atas kemampuan bakteri untuk memfermentasi gula-gula tersebut yang ditandai dengan perubahan warna dari biru menjadi kuning (Soemarno, 2003).

## 5) Uji Urea

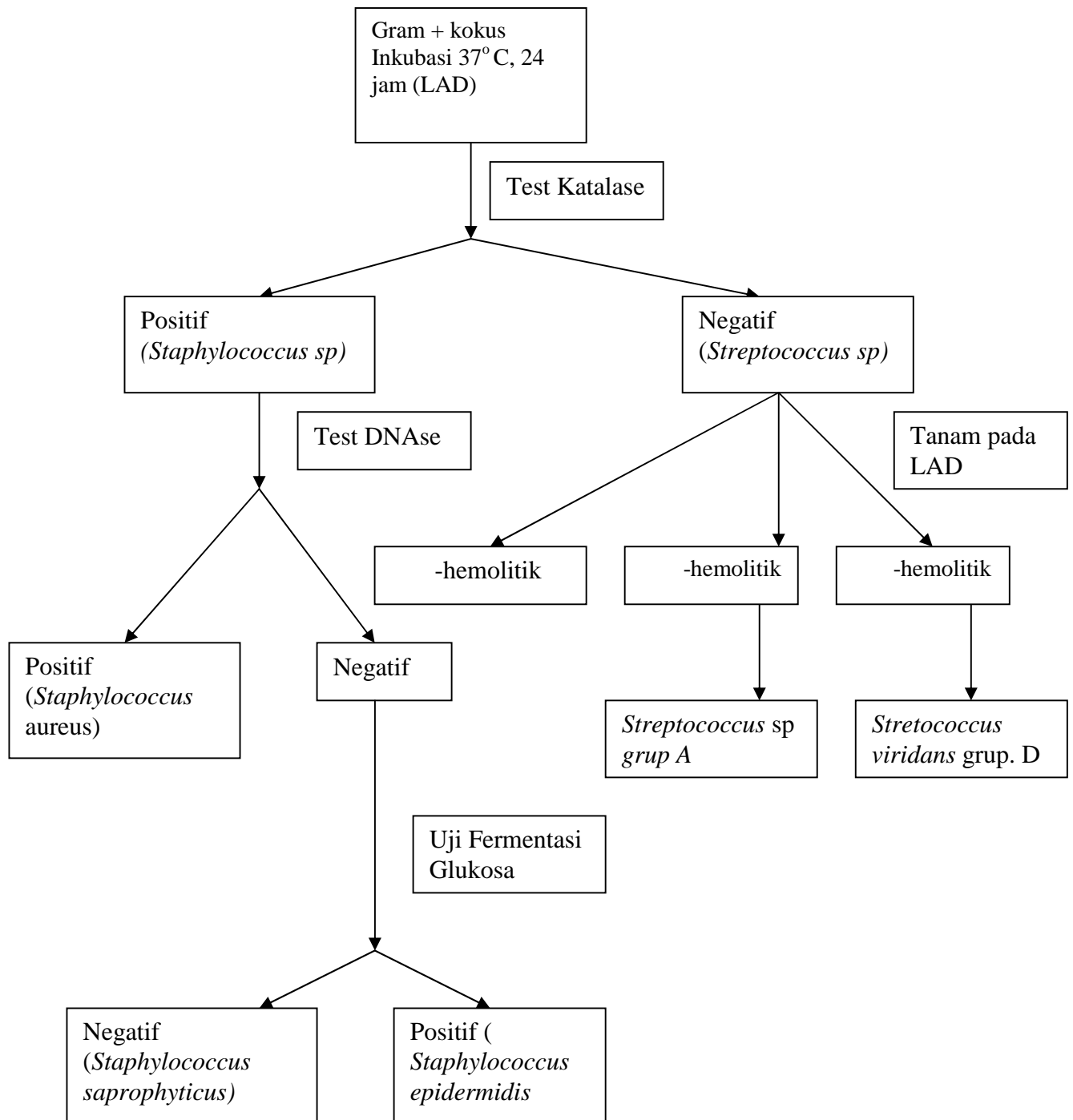
Uji hidrolisis urea dilakukan untuk melihat bakteri mampu menghasilkan enzim urease. Timbulnya warna merah muda berarti reaksi positif dan negatif warna tidak berubah.



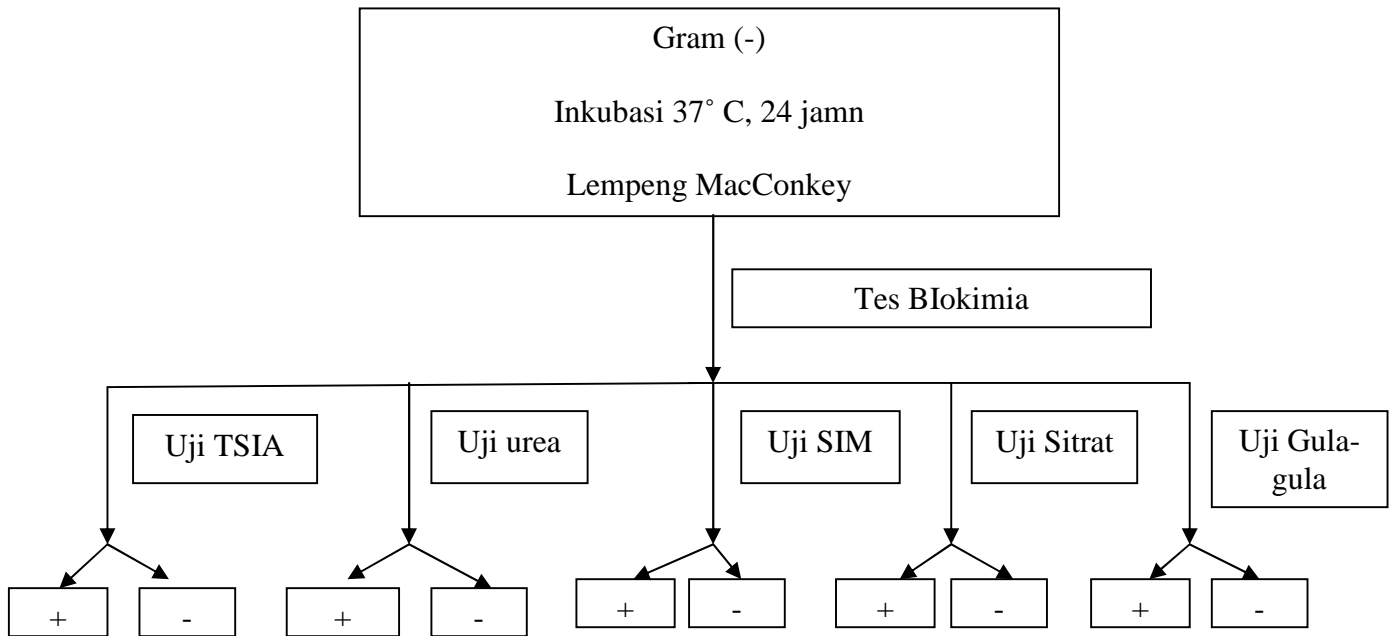


**Gambar 7. Diagram alur penelitian**

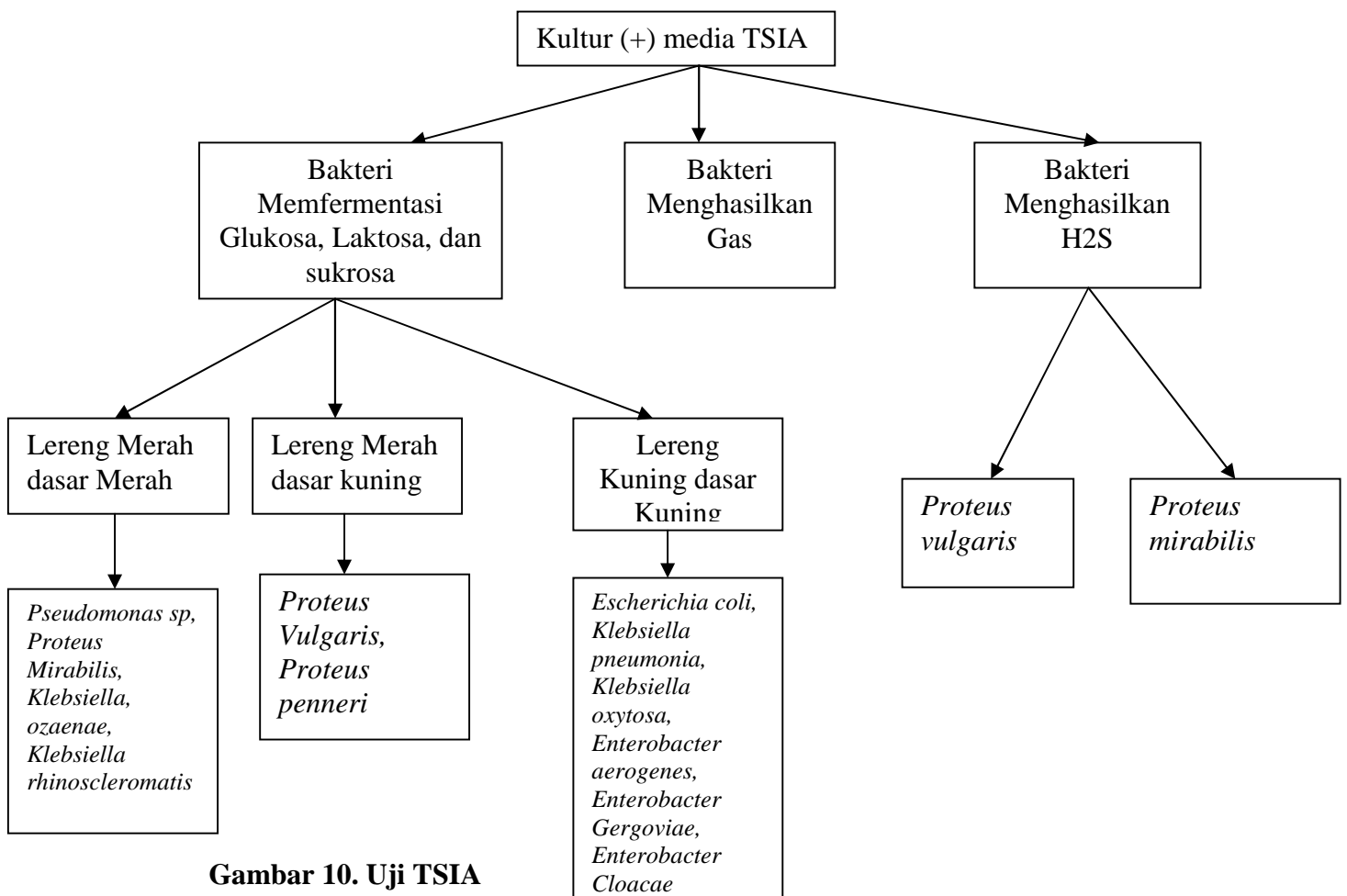
Lanjutan



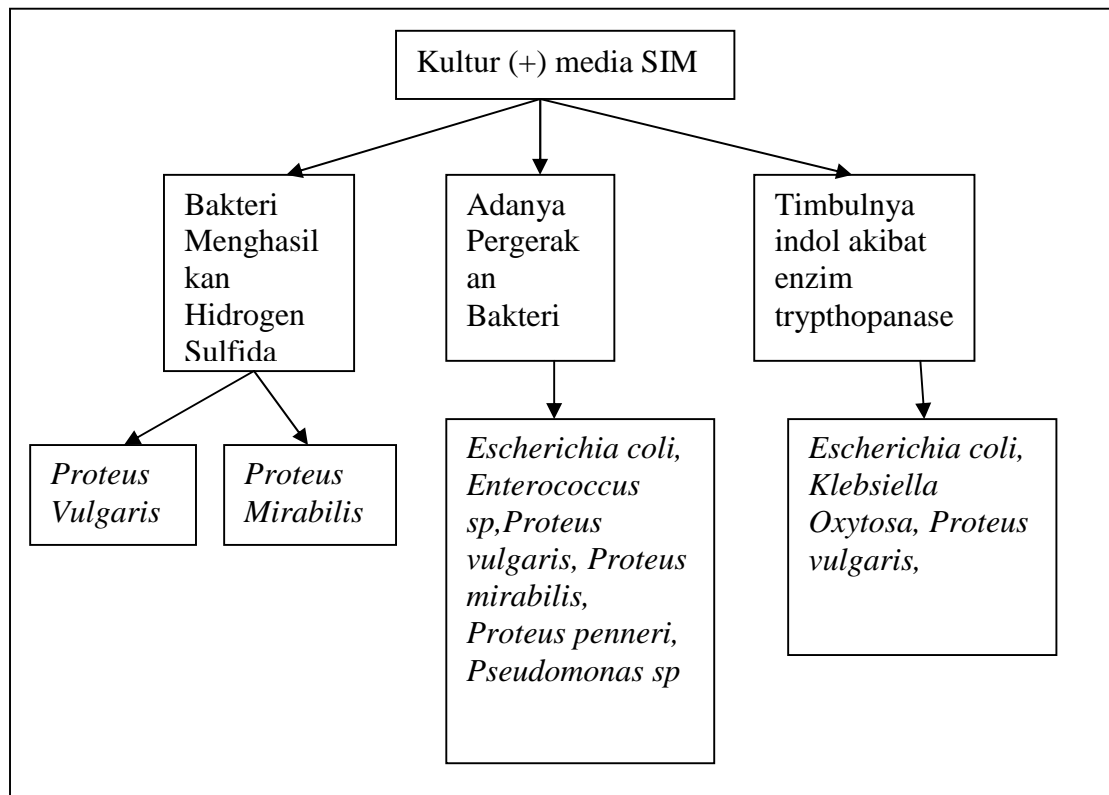
Gambar 8. Diagram identifikasi bakteri Gram positif



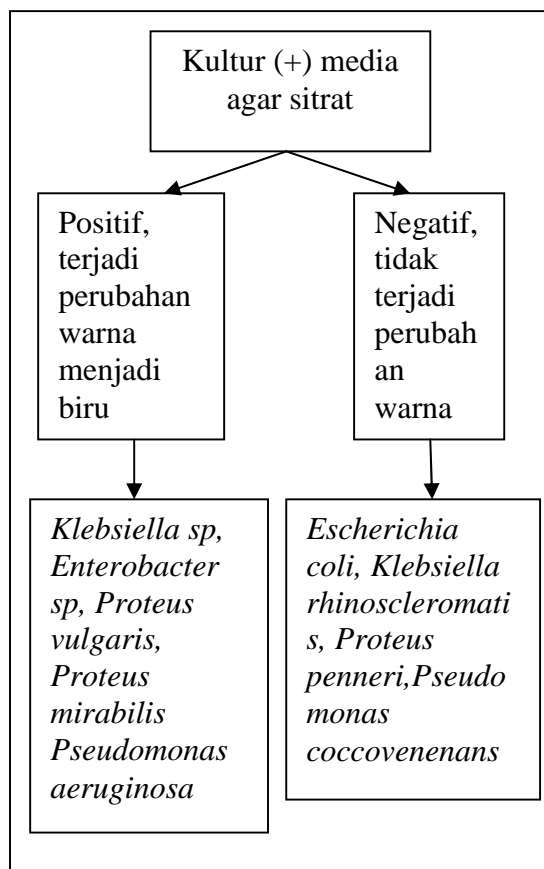
**Gambar 9. Tes biokimia Gram negative**



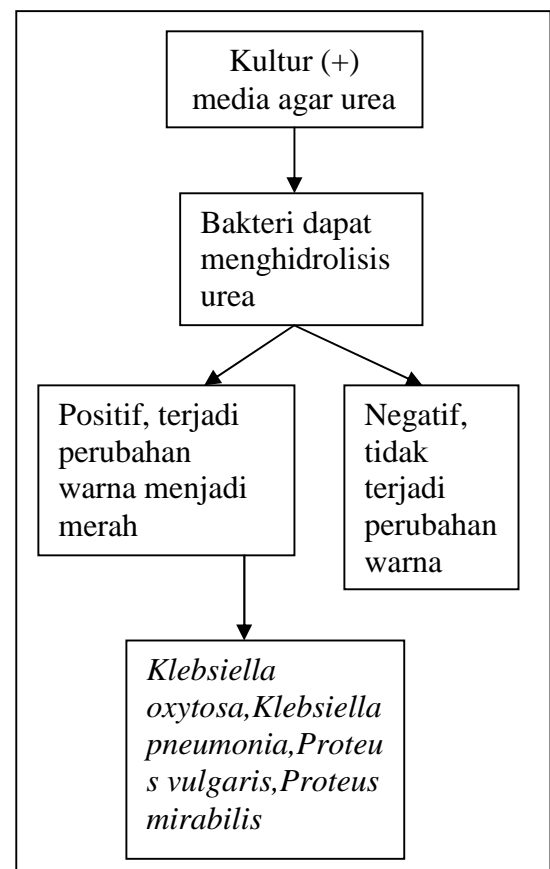
**Gambar 10. Uji TSIA**



**Gambar 11. Uji SIM (Sulfur Indole Motility)**



**Gambar 12. Uji sitrat**



**Gambar 13. Uji Urea**

**Tabel 2. Identifikasi Gram negatif**

Jenis bakteri	gluk	lakt	manit	malt	suc	indol	H <sub>2</sub> S	Urea	Mot	SC	TSIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	m/m
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	m/m
<i>Pseudomonas coccovenenans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m/m
<i>Eschericia coli</i>	+g	+g	+g	+g	+g	+	-	-	+/-	-	k/k
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+g	+g	+g	+g	+g	+	-	+	-	+	k/k
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+g	+g	+g	+g	+g	-	-	+	-	+	k/k
<i>Proteus vulgaris</i>	+g	-	-	+g	+g	+	+	+	+	+/-	m/k
<i>Proteus mirabilis</i>	+g	+/-	-	+/-	-	-	+	+	+	+/-	m/m
<i>Proteus penneri</i>	+g	-	-	+	+	-	-	+	+	-	m/k
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+g	+	+	+	+	-	-	-	+	+	k/k
<i>Enterobacter Cloacae</i>	+g	+	+	+	+	-	-	-	+	+	k/k
<i>Alcaligenes sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	m/m
<i>Providencia stuartii</i>	+	-	-	+/-	+	+	-	+	+/-	+	m/k
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	m/m