

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Deskriptif yaitu mencari gambaran tentang ada tidaknya bakteri *Eschericia coli* pada puting ibu menyusui sebelum dibersihkan.

#### **3.2 Populasi, Sampel dan Sampling**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah semua ibu yang baru melahirkan dan dirawat inap di Rumah Sakit Muhammadiyah Gresik.

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah dari ibu menyusui yang di rawat inap di Rumah Sakit Muhammadiyah Gresik.

##### **3.2.3 Tehnik Sampling**

Random atau acak

#### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan mulai bulan Desember 2017 sampai dengan bulan Juli 2018. Pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 16-17 Mei 2018 di Rumah Sakit Muhammadiyah Gresik.

Pemeriksaan sampel dilakukan pada tanggal 16-22 Mei 2018 di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

### **3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

#### **3.4.1 Variabel Penelitian**

Bakteri *Escherecia coli* pada puting ibu menyusui

#### **3.4.2 Definisi Oprasional Variabel**

Bakteri *Escherecia coli* dalam penelitian ini ditetapkan ada tidaknya bakteri *Escherecia coli* pada puting ibu menyusui sebelum dibersihkan.

Variabelnya dibedakan menjadi:

1. Positif (+) : Apabila sampel hasil pemeriksaan ditemukan bakteri *Escherecia coli*
2. Negative (-) : Apabila sampel hasil pemeriksaan tidak ditemukan bakteri *Escherecia coli*

### **3.5 Metode pengumpulan Data dan Metode Analisis**

#### **3.5.1 Metode Pengumpulan Data**

Data tentang bakteri *Escherecia coli* pada usap puting ibu menyusui di Rumah Sakit Muhammadiyah Gresik yang diperoleh dengan metode swab yang digunakan untuk memperoleh data dari pemeriksaan bakteri *Escherecia coli* pada usap puting ibu menyusui sebelum dibersihkan melalui uji laboratorium.

#### **3.5.2 Metode Analisis**

Pada pemeriksaan sampel dilakukan penanaman pada media EMB yang bersifat memecah laktosa, yang mempunyai ciri khas koloni yang berwarna hijau metalik yang dimiliki kuman *Escherecia coli* dan pada media IMVIC menunjukkan hasil Indol (+), MR (+), VP (-), Simon Citrat

(-), TSIA lereng = acid, dasar = acid, H<sub>2</sub>S (-), gas= positif (Medium Analisis Mikroorganisme).

### 3.6 Cara Kerja Sterilisasi Alat Dengan Autoclave

1. Menyiapkan alat yang akan di steril
2. Mengisi autoclave dengan air hingga batas yang sudah ditentukan
3. Memasukkan sarangan diatas air di dalam aoutoclave
4. Memasukkan alat yang akan disteril kedalam autoclave
5. Menutup autoclave dengan benar, rapat dan kencang, kunci secara berhadapan
6. Mengangkat autoclave keatas kompor, dan dihidupkan api kompor
7. Menunggu suhu hingga mencapai 121<sup>0</sup>C, dan dipertahankan selama 15 menit sampai tekanan mecapai 2 atm
8. Setelah 15 menit dibuka tutup katub sampai suhu turun (0<sup>0</sup>C) sehingga tekanan sama dengan udara dilingkungan
9. Mengangkat autoclave dengan hati-hati, dan mengeluarkan alat yang ada didalamnya

### 3.7 Alat

Timbangan analitik, tabung reaksi, erlenmeyer, bunsen, gelas arloji, kaki tiga, kasa asbes, beker glass, gelas ukur 500 ml, petridisk , ose bulat atau jarum, kertas Ph, gunting, pipet pastur, korek, spatula/pengaduk, autoclave, label, swab steril, tisu atau kapas, Karet, Rak tabung, incubator, tabung filler

### 3.8 Reagensia :

Pz steril, NaOH 0,1 N, Reagen Kovak, Hcl 0,1 N, KOH 40% , Methyl red, Alfa naftol 5% .

**a. Prosedur pembuatan Pz steril 100ml:**

1. Menimbang NaCl 0,9 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer
2. Menambahkan aquades sampai 100 ml
3. Menghomogenkan
4. Erlenmeyer ditutup dengan kasa
5. Membungkus dengan koran
6. Kemudian melakukan dengan menggunakan autoclave (Media & Reagensia, 2015)

**b. Prosedur pembuatan reagen kovak 100 ml:**

1. Menimbang 5 gram para dimetil amino benjaldehyde (PDAB)
2. Menambahkan dengan Hcl pekat 25 ml dan amyl alcohol 75 ml
3. Menghomogenkan
4. Memasukkan kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**c. Prosedur pembuatan KOH 40%, 100 ml**

1. Mengambil KOH 100% 40 ml dan di @ aquades sampai 100 ml
2. Menghomogenkan.
3. Memasukkan kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**d. Prosedur pembuatan Alfa Naftol 5%**

1. Menimbang 5 gram alfa-naftol
2. Menambahkan etanol (95 %) hingga 100 ml.
3. Menghomogenkan
4. Memasukkan kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**e. Prosedur pembuatan NaOH 0,1 N**

1. Menghitung BM terlebih dahulu

$$\begin{aligned}\text{Gram} &= N \times BE \times \frac{vl (ml)}{1000} \\ &= 0,1 \times 40 \times \frac{100 (ml)}{1000} \\ &= 0,4 \text{ gram}\end{aligned}$$

2. Menimbang NaOH 0,4 gram
3. Menambahkan aquades samapai dengan 100 ml
4. Dihomogenkan
5. Memasukkan kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**f. Prosedur pembuatan Hcl 0,1 N**

1. Menghitung jumlah zat dalam larutan pekat yang sudah diketahui konsentrasi dan nilai P (sesuai kemurnian larutan pekat dalam etiket)

**Perhitungan :**

$$\begin{aligned}\text{Jumlah zat dalam larutan pekat} &= \% \times P \\ &= 37\% \times 1,19 \\ &= 0,4403 \text{ kg} \rightarrow 440,3 \text{ gram.}\end{aligned}$$

2. Menghitung nilai N dalam konsentrasi pekat dengan nilai BE 36,46.

$$N = \frac{\text{gram}}{BE} \times \frac{1000}{v (ml)} = \frac{440,3}{36,46} \times \frac{1000}{100 (ml)} = 12,0762 \text{ N}$$

3. Dihitung jumlah pengenceran dengan nilai N 0,1

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times N_2}{N_1} = \frac{100 \times 0,1}{12,0762} = 0,8280 \text{ ml} \rightarrow 0,83 \text{ ml}$$

4. Memipet reagen HCl pekat sebanyak 0,83 ml, dan di @ aquades dalam 100 ml
5. Menghomogenkan
6. Dimasukkan kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**g. Prosedur pembuatan MR (Methyl Red)**

1. Menimbang serbuk Methyl red 1 gram
2. Memasukkan kedalam alkohol 95% sebanyak 90 ml
3. Menghomogenkan
4. Mengencerkan dengan aquades sampai 100 ml.
5. Menuang kedalam botol coklat (Media & Reagensia, 2015)

**3.9 Pembuatan Media:**

**1. EMB (*Eosin Methylene Blue*)**

**Prosedur pembuatan EMB dalam 450 ml :**

- a) Menyiapkan alat dan bahan
- b) Menimbang media EMB (30 plate, 1 plate 15 ml )  
 Perhitungan :  $\frac{36 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 450 \text{ ml} = 16,2 \text{ gram}$
- c) Melarutkan dengan aquades 450 ml di erlenmayer
- d) Memanaskan dengan api bunsen sampai larut sempurna
- e) pH (7,1), jika kurang asam tambahkan Hcl 0,1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0,1 N
- f) Melakukan steril menggunakan autoclave
- g) Menuang media pada plate yang sudah steril
- h) Menyimpan media yang sudah padat ke dalam lemari pendingin agar tidak terjadi kontaminasi
- i) Dibersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015).

## 2. *Triple Sugar Iron Agar*( TSIA )

### Prosedur pembuatan TSIA 150 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Menimbang media TSIA (30 tabung, 1 tabung 5 ml )  
Perhitungan :  $\frac{65 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 150 \text{ ml} = 9,75 \text{ gram}$
- c) Melarutkan dengan aquades 150 ml
- d) Memanaskan dengan api bunsen hingga larut sempurna
- e) pH (7,4) jika kurang asam tambahkan Hcl 0,1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0,1 N
- f) Memasukkan kedalam tabung, masing-masing tabung diisi dengan 5 ml
- g) Menutup tabung menggunakan kasa, dibungkus dengan koran dan diikat dengan karet
- h) Melakukan steril menggunakan autoclave
- i) Memiringkan tabung setelah disteril sehingga ada lereng dan dasar
- j) Menyimpan ke dalam lemari pendingin
- k) Dibersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015)

## 3. Indol

### Prosedur pembuatan Indol 150 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Menimbang (30 tabung, 1 tabung 5 ml)  
Perhitungan:  
Water pepton :  $\frac{25,5 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 150 \text{ ml} = 3,825 \text{ gram}$
- c) Melarutkan dengan aquades 150 ml
- d) Memanaskan dengan api bunsen sampai larut sempurna

- e) pH hingga (7,2-7,4) jika kurang asam ditambahkan Hcl, 0,1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0,1 N
- f) Menuang kedalam masing-masing tabung dengan cara steril
- g) Menutup masing-masing tabung reaksi dengan kapas, lalu dibungkus dengan koran dan dikaret
- h) Melakukan steril menggunakan autoclave
- i) Memasukkan ke dalam lemari pendingin
- j) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015)

#### 4. MR(*Methyl Red*) dan VP (*Voges Proskouer*)

##### Prosedur pembuatan MR, VP 200 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan (pepton,  $K_2HPO_4$ , glukosa, aquades)
- b) Menimbang Glukose,  $K_2HPO_4$ , pepton masing-masing 0,5 gram. (50 tabung, 1 tabung 4 ml)

Perhitungan:

$$\text{Glucose} : \frac{0,5 \text{ gram}}{80 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml} = 1,25 \text{ gram}$$

$$K_2HPO_4 : \frac{0,5 \text{ gram}}{80 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml} = 1,25 \text{ gram}$$

$$\text{Pepton} : \frac{0,5 \text{ gram}}{80 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml} = 1,25 \text{ gram}$$

- c) Melarutkan dengan aquades sebanyak 200 ml sampai larut sempurna
- d) pH (6,8–7), jika kurang asam ditambah Hcl, 0,1 N dan jika kurang basa ditambah NaOH, 0,1 N
- e) Memasukkan masing- masing kedalam tabung dengan cara steril

- f) Melakukan steril menggunakan autoclave
- g) Masukkan kedalam lemari pendingin
- h) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015)

## 5. Simon Citrat

### Prosedur pembuatan SC 150 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Menimbang Simon Citrat (30 tabung, 1 tabung 4 ml)  
Perhitungan:  $\frac{22,5 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 120 \text{ ml} = 2,7 \text{ gram}$
- c) Melarutkan dengan 120 ml aquades sampai larut sempurna
- d) pH hingga (6,8-7,8) jika kurang asam ditambah Hcl, 0,1 N dan jika kurang basa bisa ditambah NaOH, 0,1 N
- e) Memasukkan kedalam tabung reaksi yang sudah disiapkan secara steril
- f) Melakukan steril menggunakan autoclave
- g) Pada saat keluar membiarkan dalam posisi tegak tidak boleh miring
- h) Memiringkan pada tempat yang rata
- i) Memasukkan kedalam lemari pendingin
- j) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015)

## 6. Media Boillon

### Prosedur pembuatan Boillon 100 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Menimbang (pepton, Beef ekstrak, NaCl) (25 tabung, 1 tabung 4 ml)  
Perhitungan :

$$\text{Pepton} \quad : \frac{10 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 1 \text{ gram}$$

$$\text{Beef Exstract} \quad : \frac{3 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 0,3 \text{ gram}$$

$$\text{Nacl} \quad : \frac{5 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 0,5 \text{ gram}$$

- c) Melarutkan dengan aquades 100 ml sampai larut sempurna
- d) pH ( 7,0 ) jika kurang asam ditambah Hcl, 0,1 N dan jika kurang basa ditambah NaOH, 0,1 N
- e) Memasukkan kedalam tabung filler masing-masing 4 ml dengan cara steril
- f) Mengikat menggunakan karet
- g) Melakukan steril menggunakan autoclave
- h) Memasukkan pada lemari pendingin
- i) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Media & Reagensia, 2015)

### **3.10 Cara Penanaman Pada Media EMB (Eosin Methylen Blue)**

#### **3.10.1 Hari Pertama**

1. Memasukkan sampel swab puting ibu menyusui kedalam media boillon, kemudian di inkubasi selama 1x24 jam dan disimpan di incubator dengan suhu 37°C

#### **3.10.2 Hari Kedua**

1. Mengeluarkan media EMB di lemari pendingin, hilangkan air kondensasi dengan suhu 37°C dalam waktu 30 menit

2. Media EMB yang sudah bebas air kondensasi ditanami dengan satu mata ose media boillon dengan sampel swab puting ibu menyusui, kemudian inkubasi selama 1x24 pada suhu 37°C.

### 3.10.3 Hari Ketiga

1. Mengeluarkan media EMB di incubator, koloni yang berwarna hijau metalik di ambil satu koloni ditanam dengan ose jarum pada media TSIA dan Imvic ditanam dengan ose bulat secara steril
2. Menginkubasi semua media yang sudah ditanami selama 1x24 jam pada suhu 37°C

### 3.10.4 Hari Keempat

1. Melakukan pembacaan hasil pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*),

Lereng = acid

Dasar = acid

H<sub>2</sub>S = (-) negative

Gas = (+) positif

2. Pada media Imvic

Melakukan tes kovak, indol, dan indikator *Methyl Red*, alfa naftol.

- a. Media Indol yang sudah ditanami kuman ditambah dengan reagen kovak (2-3 tetes) melalui dinding tabung ,jika positif terdapat cincin warna merah dan jika negatif tidak terjadi perubahan warna
- b. Media MR (*Methyl Red*) yang sudah ditanami kuman ditambah dengan indicator methyl red (2-3 tetes) melalui dinding tabung,

jika positif berubah warna merah, dan jika negative tidak terjadi perubahan warna.

c. Media VP (*Voges Proskauer*) ditambah dengan reagen KOH, dan alfa naftol (1:3) melalui dinding tabung, jika positif berubah warna menjadi merah, dan jika negatif tidak terjadi perubahan warna.

d. Simon citrate jika positif berubah warna menjadi biru prusi (Modul praktikum bakteriologi, 2016).

### 3.11 Interpretasi Hasil

a) Sampel dinyatakan positif,(+) : apabila sampel puting ibu menyusui ditemukan bakteri *Escherecia coli*.

b) Sampel dinyatakan negatif,(-) : apabila sampel puting ibu menyusui tidak ditemukan bakteri *Escherecia coli*.

### 3.12 Tabulasi Hasil

Hasil pengamatan selanjutnya ditabulasi kedalam bentuk tabel berikut :

**Table 3.1 Contoh Tabulasi Data Hasil Pemeriksaan Pertumbuhan Bakteri *Escherecia coli* pada puting ibu menyusui sebelum dibersihkan di Rumah Sakit Muhammadiyah Gresik**

No.	KODE SAMPEL	HASIL IDENTIFIKASI BAKTERI <i>Escherecia coli</i> .
-----	-------------	--

		<b>POSITIF (+)</b>	<b>NEGATIF (-)</b>
1.	A <sub>1</sub>		
2.	A <sub>2</sub>		
3.	A <sub>3</sub>		
..			
..			
..			
20	A <sub>20</sub>		
<b>JUMLAH</b>			

Keterangan :

- a. Tanda positif (+) : Menunjukkan bahwa puting ibu menyusui ditemukan bakteri *Escherecia coli*.
- b. Tanda negatif (-) : Menunjukkan bahwa puting ibu menyusui tidak ditemukan bakteri *Escherecia coli*.

### 3.13 Metode Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil penelitian dikelompokkan dan dianalisa kemudian data tersebut ditabulasikan secara deskriptif dengan cara menghitung persentase positif (+) atau negative (-) bakteri *Escherecia coli* pada puting ibu menyusui.