

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah observasi laboratorik yang bersifat Deskriptif, dengan melakukan identifikasi bakteri pada karies gigi dan uji kepekaan terhadap obat kumur dengan cara biakan pada media dan melakukan pewarnaan gram.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal 22 - 30 januari 2020.

2. Tempat Penelitian

Tempat pengambilan sampel penelitian ini yaitu di TK Alghifari Kendari Permai. Tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kendari Kementerian kesehatan Republik Indonesia.

C. Sampel Uji

Pada penelitian ini sampel uji yang digunakan adalah karies gigi yang diambil secara swab di sekolah Tk Alghifari kendari Permai sebanyak 15 siswa. Maka sampel yang diambil untuk sampel uji yaitu sebanyak siswa pada sekolah Tk tersebut.

D. Instrument Penelitian

Instrument penelitian yang digunakan dalam penelitian yaitu kertas label, swab steril, alat labeling, kertas catatan dan alat dokumentasi.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data diperoleh dengan cara melakukan identifikasi bakteri pada karies gigi dan uji kepekaan terhadap obat kumur.

F. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

a. Persiapan alat

- Autoclave
- Batang pengaduk
- Botol semperot
- Cawan petri
- Cawan porselin
- Erlenmeyer
- Gelas kimia
- Inkubator
- Jembatan pewarnaan
- Kaki tiga
- Karet penghisap
- Mikroskop
- Objek gelas
- Ose lurus
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Sendok tanduk
- Spirtus
- Timbangan digital
- Waterbath

b. Persiapan Bahan

- Alkohol 96%
- Aquadest
- Cheloramfenikol
- KOH
- Larutan gentien violet

- Lugol
- Karbon fuksin
- Kapas
- Tisu
- Media NA
- Media TSIA
- Sampel Karies gigi

c. Pengambilan dan Persiapan sampel

Sampel diperoleh dari siswa/siswi sekolah Tk Alghifari kendari Permai.

d. Cara kerja pembuatan media

1). Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

- a). Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b). Lakukan penimbangan media

Penimbangan reagen atau media dilakukan sesuai dengan kebutuhan / volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 20 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 225 ml sehingga bahan yang akan ditimbang sebanyak 4,5 gram.

c). Melarutkan bahan

Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, sisa bahan yang menempel pada cawan yang digunakan menimbang dibilas dengan aquadest sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan aquadest dengan pH yang telah diatur sebanyak 225 ml lalu diaduk. Karena tidak semua langsung larut maka untuk melarutkannya digunakan waterbath, waktu pelarutan tidak ditentukan namun sesekali harus dicek hingga tidak ada lagi butiran zat pada dinding tabung atau larutan.

d). Menuang ke dalam Cawan petri

Setelah larut sempurna, larutan dituang sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri sebanyak 15 cawan petri.

e). Menyiapkan media

Setelah proses sterilisasi selesai, media diinginkan lalu dimasukan ke dalam lemari pendingin.

2. Analitik

a. Prosedur pengambilan sampel

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Kemudian pasien diminta membuka mulut tidak terlalu lebar atau mengatakan “e” . Kemudian dicari bagian gigi yang mengalami karies.
3. Ambil sampel menggunakan metode swab, selanjutnya simpat hasil swab pada tempat yang steril lalu diberi label identifitas pasien.
4. Kemudian hasil swab dibawa ke laboratorium sesegera mungkin.

b. Prosdur penanaman bakteri pada media

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Sampel karies gigi di inkubasi pada media NA dengan cara menggores permukaan media menggunakan ose bulat dan jangam sampai merusak media.
3. Kemudian diinkubasi pada inkubator selama 1 x 24 jam dengan suhu 37°C.
4. Setelah itu lakukan pengamatan pada media, apabila terjadi kekeruhan pada media NA menandakan positif pertumbuhan bakteri, jika tidak terjadi kekeruhan maka hasilnya negatif.

c. Pewarnaan gram

1. Diambil koloni pada media NA kemudian diletakkan pada objek gelas kemudian diratakan dengan ose
2. Dikeringkan dengan cara fiksasi diatas nyala api kecil
3. Dilakukan pewarnaan gram:
 - a). Tungkan lauratrn gentient violet diatas sediaan, diamkan selma 1 – 2 menit.
 - b. Cuci sediaan dengan air mengalir secara perlahan.

- c). Tuangkan larutan lugol diatas sediaan sampai menutupi permukaan sediaan. Diamkan selama 1 menit.
 - d). Cuci sediaan dengan air mengalir secara perlahan.
 - e). Cuci dengan alkohol 96% selama 5 – 10 detik sampai warna violet hilang.
 - f). Cuci sediaan dengan air mengalir secara perlahan.
 - g). Tuangkan larutan carbol fuksin, diamkan selama 10 – 15 detik .
 - h). Cuci dengan air mengalir secara perlahan lalu keringkan.
4. Setelah kering sediaan ditetesi oil imersi.
 5. Kemudian periksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x.
- d. Uji Biokimia
- Uji biokimia bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan dengan cara menguji fermentasi karbohidrat, pembentukan CO₂ dan H₂S. Dilakukan dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan cara menusukan inokulum bakteri secara vertikal sedalam ³/₄ pada medis miring dan digores pada bagian *slant* media kemudian diinkubasi selama 24 jam.
- e. Metode difusi agar (Disk Diffusion Method)
1. Disiapkan biakan bakteri *Streptococcus Mutans*
 2. Dibuat suspensi bakteri dengan cara inokulasi biakan pada NaCl 0,9%.
 3. Diberi label masing – masing cawan
 4. Ditambahkan 0,1 mL suspensi bakteri pada media NA dan di ratakan menggunakan driglle sky
 5. Dibiarkan 5 – 10 menit agar biakan terdifusi kedalam media
 6. Dichelupkan masing – masing *paper disk* pada obat kumur selama 10 menit.
 7. Diletakkan *paper disk* dengan pinset steril, atur jarak antara masing – masing paper disk.
 8. Dilakukan kontrol positif dengan menggunakan cheloramfenikol.

9. Dibungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam

10. Diamati ada tidaknya zona bening pada daerah sekitar *paper disk*.

3. Pasca analitik

- a. Media Natrium Agar (NA) : Akan terjadi kekeruhan apabila terjadi pertumbuhan bakteri
- b. Pewarnaan gram : Jika bakteri yang didapatkan bakteri dari golongan bakteri positif maka akan berwarna ungu dan jika dari golongan bakteri negatif maka akan berwarna merah.
- c. Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Hasil positif bakteri memfermentasi glukosa ditandai dengan bagian dasar (*butt*) media akan berwarna kuning bagian *slant* tetap tetap berwarna merah, sedangkan jika mikroorganisme memfermentasi laktosa dan sukrosa ditandai dengan bagian *slant* dan *butt* media berubah berwarna kuning. Media TSIA juga dapat digunakan untuk pengujian produksi gas H₂S dan CO₂ oleh bakteri. Hasil positif H₂S ditandai dengan adanya endapan hitam pada dasar media dan uji CO₂ positif ditandai dengan terangkatnya media.

G. Jenis Data

1. Data primer yaitu data yang diperoleh langsung dari hasil penelitian Identifikasi Bakteri pada Penderita Karies Gigi dan Uji Kepekaan Terhadap Obat Kumur
2. Data sekunder yaitu data yang dikumpulkan dari buku, jurnal – jurnal penelitian dan hasil penelitian terdahulu.

H. Pengolahan Data

1. Coding, yaitu memberikan kode pada sampel anak tk Alghifari.
2. Editing, yaitu mengkaji dan meneliti data yang telah terkumpul.
3. Entry, yaitu memasukan data dalam program komputer untuk dilakukan analisis lanjut.

4. Tabulasi, yaitu mempersiapkan tabel yang diperoleh langsung dari hasil penelitian Identifikasi Bakteri pada Penderita Karies Gigi dan Uji Kepekaan Terhadap Obat Kumur.

I. Analisis Data

Data yang didapatkan dikumpulkan mulai dari tahap isolasi dan identifikasi bakteri lalu pada tahap uji daya hambat menggunakan rumus.

Cara hitung diameter rata-rata zona hambat :

$$\frac{(AB + CD) - 6}{2}$$

Keterangan :

AB : Diameter vertikal

CD : Diameter horizontal

J. Penyajian Data

Data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi dan kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi.

K. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, masalah etika sangat diperhatikan dengan menggunakan metode :

1. *Anonymity* (tanpa nama)

Dilakukan dengan cara tidak memberikan nama pada siswa siswi hanya menuliskan kode pada sampel.

2. *Confidentiality* (Kerahasiaan)

Menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah – masalah lainnya. Informasi yang dikumpulkan dijamin kerahasiaannya oleh peneliti, hanya kelompok data tertentu yang akan dilaporkan pada hasil riset.