

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan yaitu *deskriptif observasional*. dimana penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menggambarkan keberadaan suatu bakteri *Proteus sp* pada sampel pus luka diabetes di BLUD Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara atau menentukan masalah yang digali melalui pengamatan yang terjadi di lapangan secara obyektif dengan menggunakan metode isolasi dan identifikasi bakteri.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Untuk pengambilan sampel telah dilaksanakan di BLUD Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara.
- b. Untuk penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan 14 Maret s/d 30 Mei 2023.

C. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah luka penderita diabetes di BLUD Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara dengan ciri-ciri luka gangren sebanyak 4 responden sesuai dari hasil observasi.

2. Bahan uji

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah pus luka diabetes melitus yang diambil secara swab. Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Accidental sampling* yakni teknik pengambilan sampel berdasarkan jumlah kejadian yang ditemui pada saat melakukan penelitian.

D. Prosedur pengumpulan data

Sampel luka diabetes dengan ciri-ciri berupa cairan berbau tak sedap, berwarna kekuningan yang berada di area jaringan luka penderita diabetes yang terlebih dahulu diambil nanahnya dengan cara swab, pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *Accidental sampling*.

1. Data primer diperoleh dari hasil wawancara langsung yang bersumber dari Logbook dan pemeriksaan bakteri *Proteus sp* pada luka diabetes di BLUD Rumah Sakit Bahteramas Kota Kendari.
2. Data sekunder diperoleh dari data rekam medis di BLUD Rumah Sakit Bahteramas Kota Kendari, jurnal penelitian, buku literature yang berhubungan dengan bakteri pada luka diabetes.

E. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dilakukan melalui beberapa pemeriksaan laboratorium secara langsung yaitu mulai dari tahap pra analitik, analitik, hingga pasca analitik.

1. Pra Analitik

a. Persiapan sampel

Sampel pus luka diabetes yang diambil menggunakan cotton swab steril kemudian disimpan pada media transport swab dan dimasukkan ke dalam *coolbox*.

b. Persiapan alat dan bahan

1) Alat yang digunakan :

- a) Autoclave
- b) Batang pengaduk
- c) Botol semprot
- d) Bunsen
- e) Cawan petri
- f) Box sampel/Coolbox
- g) Erlenmeyer
- h) Gelas ukur
- i) Incubator

- j) Jembatan pewarnaan
 - k) Kaki tiga
 - l) Korek api
 - m) Mikroskop
 - n) Objek glass
 - o) Ose lurus
 - p) Ose bulat
 - q) Pipet tetes
 - r) Tabung reaksi
 - s) Timbangan digital
 - t) Waterbath
- 2) Persiapan bahan :
- a) Aquadest
 - b) Alkohol 96%
 - c) Gentient violet
 - d) Kertas HVS bersih
 - e) Kertas label
 - f) KOH 40%
 - g) Kertas indikator pH
 - h) Kapas
 - i) Lugol
 - j) Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
 - k) Media MCA (*Mac Conkey Agar*)
 - l) Media IMViC (*Indol, Methyl red, Voges proskauer, Citrat*)
 - m) Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)
 - n) Media transport swab
 - o) NaCl
 - p) Oil imersi
 - q) Pipet tetes/ukur
 - r) Reagen kovac's
 - s) Reagen α -naftol 5%

- t) Reagen *Methyl red*
- u) Sampel pus luka diabetes
- v) Sarung tangan
- w) Safranin

c. Sterilisasi alat :

- 1) Melakukan sterilisasi pada alat sebelum digunakan yaitu dimana peralatan yang akan digunakan pertama dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan.
- 2) Lalu, setiap peralatan dibungkus dengan kertas HVS yang bersih
- 3) Kemudian sterilisasi menggunakan autoclave pada temperatur 121°C dalam waktu 15 menit.

d. Proses pengambilan sampel :

- 1) Memberi penjelasan pada pasien mengenai tindakan yang akan dilakukan
- 2) Menanyakan identitas pasien yaitu nama, alamat, umur, tanggal lahir, jenis kelamin, nomor telepon pasien.
- 3) Kemudian meminta persetujuan pasien untuk diambil sampelnya dengan memberikan lembar *Informed Consent*.
- 4) Setelah mendapatkan persetujuan oleh pasien, petugas kesehatan yang sedang bertugas merawat pasien tadi akan membuka perbannya yang dimana sebelumnya telah dibasuhi dengan NaCl fisiologis sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lapisan eksudat yang mengering atau kotoran.
- 5) Lalu buka media transport swab dari pembungkusnya kemudian usapkan bagian cotton swab pada luka tanpa menyentuh bagian tepi luka.
- 6) Kemudian masukkan cotton swab tersebut kedalam media amies dan tutup tabung dengan erat dan tidak lupa untuk memberikan identitas nama pasien dengan kertas label, Setelah itu barulah dibawah ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan box sampel.

e. Pembuatan media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) :

- 1) Penimbangan reagen/media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 37 gram dalam pengenceran 1000 mL, sementara yang akan di buat 30 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 1,11 gram.
- 2) Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan tambahkan aquadest sebanyak 30 mL, lalu ukur pH dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. kemudian panaskan menggunakan waterbath untuk melarutkan (homogenkan) media tersebut.
- 3) Kemudian media dipipet sebanyak 5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit .
- 4) Setelah disterilkan keluarkan tabung dari *autoclave* Kemudian tunggu beberapa menit sampai media tidak terlalu panas lalu media siap untuk di lakukan penanaman.

f. Pembuatan Media MCA (*Mac Conkey Agar*)

- 1) Penimbangan reagen/media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 51,53 gram dalam pengenceran 1000 mL, sementara yang akan di buat 80 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 4,1 gram.
- 2) Kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 80 mL, lalu ukur pH dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. Kemudian panaskan (homogenkan) sampai larut dengan baik dengan menggunakan waterbath.
- 3) Setelah di homogenkan kemudian gelas erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas. Kemudian dimasukkan kedalam *autoclave* untuk disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C . Setelah itu dikeluarkan dari autoclave.

- 4) Selanjutnya buka kapas yang menutupi mulut erlenmeyer dan panaskan mulut erlenmeyer diatas api spirtus.
 - 5) Kemudian lakukan penuangan media pada cawan petri yang telah disiapkan sebanyak 20 mL dan diamkan sampai dingin.
 - 6) Setelah media menjadi agar-agar yang artinya media siap untuk di lakukan penanaman.
- g. Pembuatan media IMViC (*Indol, Methyl red, Voge's prouskauer, Citrat*)
- 1) Media SIM (*Sulfide Indol Motility*)
 - a) Penimbangan reagen atau media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 36,23 gram dalam pengenceran 1000 mL, sementara yang akan di buat 30 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 1,08 gram.
 - b) Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan tambahkan aquadest sebanyak 30 mL, lalu ukur pH dengan $7,4 \pm 0,2$. kemudian panaskan menggunakan waterbath untuk melarutkan/(homogenkan) media tersebut.
 - c) Kemudian media dipipet menggunakan pipet ukur sebanyak 5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - d) Setelah disterilkan keluarkan tabung dari *autoclave* Kemudian tunggu beberapa menit sampai media tidak terlalu panas lalu media siap untuk di lakukan penanaman.
 - 2) Media MR-VP (*Methyl Red-Voge's-Proskauer*)
 - a) Penimbangan reagen atau media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 17,0 gram dalam pengenceran 1000 mL,

sementara yang akan di buat 50 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 0,85 gram.

- b) Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan tambahkan aquadest sebanyak 50 mL, lalu ukur pH dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. kemudian panaskan menggunakan waterbath untuk melarutkan/(homogenkan) media tersebut.
 - c) Kemudian media dipipet menggunakan pipet ukur sebanyak 5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - d) Setelah disterilkan keluarkan tabung dari *autoclave* Kemudian tunggu beberapa menit sampai media tidak terlalu panas lalu media siap untuk di lakukan penanaman.
 - e) Tabung sehingga kaldu terlihat berbuih. Hasil reaksi dapat terlihat paling lambat 30 menit.
- 3) Media SCA (*Simmon Citrate Agar*)
- a) Penimbangan reagen atau media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 24,28 gram dalam pengenceran 1000 mL, sementara yang akan di buat 30 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 0,72 gram.
 - b) Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan tambahkan aquadest sebanyak 30 mL, lalu ukur pH dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. kemudian panaskan menggunakan waterbath untuk melarutkan (homogen) media tersebut.
 - c) Kemudian media dipipet menggunakan pipet ukur sebanyak 5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan bungkus dengan kertas HVS. Kemudian sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

- d) Setelah disterilkan keluarkan tabung dari *autoclave* kemudian miringkan tabung lalu tunggu beberapa menit sampai media tidak terlalu panas lalu media siap untuk di lakukan penanaman.
- 4) Pembuatan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)
 - a) Penimbangan reagen atau media dilakukan sesuai kebutuhan/ Volume yang akan dibuat dengan melihat cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 64,52 gram dalam pengenceran 1000 mL, sementara yang akan dibuat 30 mL sehingga bahan yang akan ditimbang 1,9 gram. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan larutkan dengan aquades sebanyak 30 mL, lalu ukur pH dengan $7,4 \pm 0,2$. kemudian panaskan (homogenkan) sampai larut dengan baik menggunakan api spirtus.
 - b) Kemudian tuang media TSIA ke dalam tabung reaksi, jangan sampai penuh sekitar 5 mL selanjutnya ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas HVS.
 - c) Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* bersama dengan tabung reaksi yang sudah ditutup dengan kapas selama 15 menit dengan suhu 121°C .
 - d) Setelah sudah disterilisasi dikeluarkan dari *autoclave* untuk didiamkan dan dimiringkan setelah media menjadi agar maka media siap untuk di lakukan penanaman.

2. Analitik

- a. Inokulasi bakteri pada media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)

Sampel pus ulkus diabetes dimasukkan pada media BHIB, aduk catton swab dengan memutar hingga media dan sampel terhomogen, kemudian media BHIB diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Jika terjadi kekeruhan pada media BHIB, dilanjutkan pada media differensial atau selektif (penghambat) yaitu media MCA.

b. Inokulasi bakteri pada media MCA (*Mac Conkey Agar*)

Bakteri yang terdapat di media BHIB, diambil dengan menggunakan ose yang sudah difiksasi untuk dilakukan isolasi kedalam MCA dengan menggosokkan diatas media secara *zig-zag*. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, jika ada pertumbuhan koloni bakteri lakukan pewarnaan gram.

c. Pewarnaan gram

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Teteskan NaCl pada kaca objek
- 3) Pijarkan ose pada bunsen dan tunggu hingga dingin
- 4) Ambil koloni pada media MCA kemudian diletakkan pada objek gelas yang berisi NaCl kemudian diratakan dengan ose.
- 5) Lalu dikeringkan dengan cara fiksasi diatas api spiritus sebanyak 3 kali.
- 6) Tetesi sediaan dengan gentian violet selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir.
- 7) Tetesi sediaan dengan lugol selama 1 menit
- 8) Kemudian genangi dengan alkohol 95% hingga pucat selama 30 detik.
- 9) Cuci dengan aquadest dan genangi dengan fucsin selama 1 menit, lalu cuci lagi dengan aquadest.
- 10) Keringkan dan periksa di mikroskop dengan perbesaran 100x dengan menambahkan oil imersi.

d. Inokulasi bakteri pada uji IMViC (*Indol, Methyl red, Voges proskauer, Citrat*)

1) Media SIM (*Sulfide Indol Motility*)

Siapkan ose jarum dan panaskan hingga pijar lalu diamkan beberapa saat. Ambil koloni bakteri pada media MCA lalu tusukkan pada media SIM secara lurus dan tepat ditengah. Letakkan media pada inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

Setelah itu tambahkan reagen kovac's sebanyak 3 tetes, lalu kocok perlahan.

2) Media MP-VP (*Methyl Red-Voge's-Proskauer*)

Ambil koloni bakteri yang telah tumbuh pada media MCA menggunakan ose bulat yang telah dipanaskan hingga pijar dan didiamkan beberapa saat. Masukkan ose ke dalam tabung reaksi, aduk dengan memutar dan menik turunkan ose hingga koloni tercampur dengan larutan. Letakkan media pada inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C. setelah di inkubasi tambahkan reagen Methyl Red sebanyak 3 tetes pada media MR, lalu tambahkan alfanaftol sebanyak 15 tetes dan reagen KOH sebanyak 10 tetes untuk media VP.

3) Media SCA (*Simmon Citrate Agar*)

Ambil koloni bakteri yang telah tumbuh pada media MCA menggunakan ose bulat yang telah dipanaskan hingga pijar dan didiamkan beberapa saat lalu goreskan ose pada permukaan media Sitrat (pada bagian pangkal miring media). Letakkan media pada inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

e. Penanaman bakteri pada uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

- 1) Ambil koloni pada isolat media MCA menggunakan ose lurus yang steril
- 2) Kemudian inokulasi pada media TSIA dengan cara posisi ose ditusuk sampai dasar (*butt*) dan bagian yang miring (*slant*) digoreskan dengan metode zig-zag pada permukaan.
- 3) Tutup rapat dengan kapas lalu masukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

3. Pasca Analitik

1. Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)

Terjadinya pertumbuhan bakteri jika terjadi kekeruhan pada media.

2. Media MCA (*Mac Conkey Agar*)

Adanya pertumbuhan koloni *Proteus sp* yaitu membentuk koloni bulat sedang besar, berwarna merah muda, sedikit cembung, *smooth*, bakteri ini tidak memfermentasi laktosa melainkan senyawa yang bersifat basa pada media MCA.

3. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram jika merupakan bakteri gram negatif, bakteri *Proteus sp* maka akan terlihat dibawah mikroskop dengan lapang pandang bentuk batang, bersifat gram negatif, dan berwarna merah.

4. Uji biokimia pada IMViC (*Indol, Methyl red, Voge's prouskauer, Citrat*)

a. Media *Sulfide Indol Motility* (SIM)

Hasil positif (+) pada uji *Sulfur* adalah terbentuknya warna hitam pada endapan media.

Hasil positif (+) pada uji *Indol* adalah terbentuknya warna merah pada media setelah ditambahkan reagen *erlich*.

Hasil positif (+) pada uji *Motility* adalah terbentuknya pergerakan bakteri pada tusukkan media.

b. Media *Methyl Red* dan *Voge's-Proskauer* (MR-VP)

Hasil positif (+) pada uji *Methyl Red* adalah terbentuknya warna pada media dari warna kuning menjadi merah setelah ditambahkan reagen *methyl red*. Hasil negatif (-) pada uji *Voge's-Proskauer* adalah tidak terbentuknya perubahan warna merah setelah ditambahkan reagen alfa-naftol 5% dan KOH 40%.

c. Media SCA (*Simmon Citrate Agar*)

Hasil positif pada uji sitrat adalah adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

5. Uji biokimia *Triple Sugar Iron Agar* TSIA

Hasil pengamatan pada media TSIA menandakan adanya bakteri *Proteus sp* jika media memberikan reaksi alkali berwarna merah pada bagian lereng (*slant*) dan dasar (*butt*) tabung. Serta terbentuknya H₂S yang ditandai dengan endapan hitam pada dasar tabung, serta tidak terbentuknya gas yang diamati pada bagian dasar media.

F. Instrument Penelitian

Instrument penelitian yang digunakan yaitu Logbook, hasil pemeriksaan, dan Informed Consent.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer dalam penelitian ini adalah data yang bersumber dari hasil penelitian terhadap sampel yang dilakukan berdasarkan pemeriksaan pembiakan dalam memperoleh isolat bakteri.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari berbagai jurnal penelitian yang berhubungan dengan bakteri pada luka diabetes melitus dan berbagai buku literature tentang bakteri *Proteus sp* yang berada pada luka diabetes melitus. Serta data rekam medis yang diambil dari tempat penelitian di BLUD Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data yang telah diperoleh dari hasil penelitian ini dikerjakan melalui beberapa tahap yaitu sebagai berikut :

1. *Coding*, yaitu memberikan kode pada sampel luka penderita diabetes yang diteliti untuk memudahkan dalam menganalisis sampel sesuai dari data yang terkumpul disetiap instrument penelitian.
2. *Tabulating*, yaitu membuat tabel data yang sesuai dengan tujuan penelitian, digunakan agar mempermudah proses analisa hasil. Dalam penelitian ini hasil data disajikan dalam bentuk tabel yang akan disesuaikan dengan

variabel yang dipilih, sehingga dapat di analisis sampel luka penderita diabetes mana yang teridentifikasi bakteri *Proteus sp* pada luka penderita diabetes.

I. Analisa Data

Data yang diperoleh berupa data hasil analisis dengan menggambarkan keberadaan bakteri *Proteus sp* secara deskriptif observasioal yaitu melalui hasil pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan metode isolasi dan identifikasi bakteri kemudian di buat dalam bentuk tabel dan dinarasikan, dibahas serta di ambil kesimpulan.

J. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini yaitu data yang didapatkan dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan penjelasan mengenai hasil yang telah didapatkan serta di deskriptif dengan jelas.

K. Etika Penelitian

Ketika akan melakukan penelitian, penelitian memandang perlu adanya rekomendasi dari pihak atas, pihak lain dengan mengajukan permohonan izin kepada instansi tempat penelitian. Setelah mendapat persetujuan barulah dilakukan penelitian dengan menekankan masalah etika penelitian yang meliputi :

a. *Informed Consent* (penjelasan dan persetujuan)

Lembar persetujuan ini diberikan kepada responden yang akan diteliti yang memenuhi kriteria inklusi dan disertai judul penelitian dan manfaat penelitian, bila subjek menolak maka peneliti tidak akan memaksakan kehendak dan tetap menghormati hak-hak subjek.

b. *Anonimti* (tanpa nama)

Untuk menjaga kerahasiaan maka peneliti tidak akan mencantumkan nama responden, tetapi lembar tersebut diberikan kode.

c. *Confidentiality* (kerahasiaan)

Kerahasiaan responden dijamin oleh peneliti dan hanya kelompok data tertentu yang akan dilaporkan sebagai hasil peneliti.