

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan yaitu deskriptif dengan pendekatan analisis laboratorik.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Kendari.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 11 Mei – 30 Mei 2023

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh balita yang berada di Wilayah Pesisir Kecamatan Soropia dengan jumlah 32 balita.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah 32 balita yang berada di Wilayah Pesisir Kecamatan Soropia dengan usia 0-65 bulan dengan bahan uji berupa feses. Adapun teknik pengambilan sampel yang digunakan yaitu dengan menggunakan purposive sampling. Purposive sampling yaitu peneliti mempertimbangkan kriteria sampel untuk memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti dari karakteristik populasi.

a) Kriteria Inklusi

- Anak balita umur 0-65 bulan berjenis kelamin laki-laki atau perempuan yang berada di wilayah kecamatan soropia.
- Berkonsistensi padat, dan cair.
- Orang tua balita bersedia untuk ikut terlibat sebagai subjek dalam penelitian.

b) Kriteria Eksklusi

- Tidak berkonsistensi padat, dan cair.

- Orang tua tidak bersedia untuk ikut terlibat sebagai subjek dalam penelitian

D. Pengumpulan data

Pengumpulan data dimulai dari pengamatan (observasi), wawancara terhadap pasien, pengumpulan jurnal, dan data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium secara langsung yaitu dengan melakukan tahapan melalui pengamatan hasil pewarnaan atau pemeriksaan secara langsung.

E. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

a. Alat, Media, dan Reagensia

1) Alat

Alat yang digunakan adalah :

- Autoclave
- Waterbath
- Beaker glas
- Box Styrofoam
- Bunsen
- Batang pengaduk
- Cawan petri
- Erlenmeyer
- Inkubator
- Korek api
- Ose bulat
- Pipet tetes
- Pinset
- Tabung reaksi
- Timbangan digital
- Spidol

2) Bahan (Media)

- a. Bahan uji : *feses* balita
- b. Aquadest
- c. Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
- d. Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)
- e. Media TSIA
- f. Kertas pH
- g. Pot sampel
- h. Objek glass
- i. Oil imersi
- j. Kapas
- k. Sarung tangan
- l. Masker
- m. Kertas label

3) Reagensia

Pengecetan gram : *Crystal violet*, *lugol's iodine*, alkohol 96% dan safranin.

2. Analitik

a. Prosedur persiapan

1. Sterilisasi Alat

- a. Peralatan yang akan digunakan dicuci hingga bersih, kemudian dikeringkan.
- b. Bungkus dengan kertas koran setiap peralatan.
- c. Lalu sterilisasi menggunakan *autoklaf* pada temperature 121°C dalam waktu 15 menit

2. Preparasi sampel

- a. Memberikan penjelasan kepada responden mengenai tindakan yang akan dilakukan
- b. Memberikan surat persetujuan untuk ditanda tangani oleh orang tua subyek maka dilakukan penjelasan pengambilan bahan pemeriksaan.

- c. sampel feses yang diambil adalah feses segar yang ditampung secara langsung oleh orang tua subyek.
- d. Masing-masing orang tua subyek diberikan pot sampel feses untuk menampung feses dan disertai lembar kertas yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor pot sampel feses.
- e. Selain nomor pot sampel feses, kertas juga berisikan nama subyek, usia, dan jenis kelamin.
- f. Pot sampel feses dikembalikan pada hari yang sama saat pemberian atau pada saat itu juga.
- g. Sampel dibawa ke laboratorium kurang dari delapan jam pengambilan.
- h. Sampel feses ditanam langsung pada media BHIB untuk menumbuhkan bakteri.
- i. Jika terjadi kekeruhan maka dilanjutkan dengan penanaman pada media SSA.

3. Pembuatan Media

1. Pembuatan Media BHIB

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Timbang *reagen* BHIB sebanyak 12,92 gram yang diletakkan didalam cawan porselin dan ditimbang pada timbangan digital.
- c. Reagen BHIB yang telah ditimbang dituang kedalam *erlenmeyer* 350 ml. Sisa reagen yang menempel pada cawan yang digunakan menimbang dibilas dengan aquadest yang sebelumnya telah diukur menggunakan gelas ukur yaitu sebanyak 120 ml.
- d. Dibuat sesuai kebutuhan dan mengukur pH dengan indikator $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$
- e. Panaskan media di waterbath agar reagen BHIB larut sempurna melalui pemanasan. Aduk media hingga larut sempurna menggunakan batang pengaduk. Media dipanaskan jangan sampai mendidih.

- f. Kemudian media BHIB dituangkan ke tabung reaksi yang telah di sterilkan.
 - g. Cawan petri yang telah terisi dengan larutan ditutup kemudian disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - h. Setelah proses sterilisasi selesai, media di dinginkan lalu disimpan di lemari es.
2. Pembuatan Media SSA
- a. Timbang 41,58 gram (atau sesuaikan pada botol media SSA) bubuk media SSA, larutkan dengan aquadest sebanyak 660 ml.
 - b. Kemudian dua ukur pH dengan indikator $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$
 - c. Kemudian panaskan media dengan waterbath sampai larut dengan baik, setelah itu biarkan hingga dingin kemudian panaskan kembali lalu tuang kedalam cawan petri, biarkan hingga padat.
 - d. Media disimpan dalam lemari es jika tidak langsung digunakan, hal ini merupakan upaya menghindari kontaminasi bakteri.
4. Pembuatan Media TSIA
- a. Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 64,52 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 180 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 11,6 gram.
 - b. Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 180 mL, dan ukur Ph dengan indicator $7,4 \pm 0,2$. Kemudian dipanaskan sampai larut dengan baik.
 - c. Kemudian tuang media TSIA kedalam tabung reaksi, jangan sampai penuh sekitar 5 ml selanjutnya ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas aluminium.
 - d. Selanjutnya disterilisasi menggunakan alat autoklaf bersama

dengan tabung reaksi yang sudah ditutup dengan kapas selama 15 menit dengan suhu 121°C. Setelah sudah disterilisasi dikeluarkan dari autoklaf untuk didiamkan dan dimiringkan lalu masukkan kedalam kulkas.

5. Prosedur Penanaman Bakteri

1) Isolasi sampel *feses* balita pada media BHIB

- a. Peralatan yang dipakai disiapkan dalam keadaan steril dan semua pekerjaan dilakukan secara aseptis.
- b. Sampel *feses* balita di ambil menggunakan ujung ose dan di isolasi pada media BHIB lalu di homogenkan.
- c. Inkubasi media BHIB tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator.
- d. Jika terjadi kekeruhan pada media BHIB, di lanjutkan pada media selektif yaitu media SSA.
- e. Jika tidak terjadi kekeruhan pada media BHIB tidak dilanjutkan pada media SSA

2) Inokulasi bakteri pada media SSA

- a. Bakteri yang tersangka pada media BHIB, diambil dengan menggunakan ose yang sudah di fiksasi
- b. Isolasi pada media SSA dengan cara digoreskan
- c. Inkubasi media SSA tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator.
- d. Amati ciri koloni yang tumbuh pada media SSA kemudian lakukan pewarnaan gram,
- e. Jika tida ada pertumbuhan koloni pada media SSA maka tidak dilakukan pada pewarnaan gram.

6. Identifikasi Bakteri

Identifikasi koloni secara makroskopis dilihat berdasarkan warna koloni, bentuk koloni, dan tepian koloni.

- a. Gores setipis mungkin koloni yang tumbuh pada media SSA, letakkan diatas objek glas.

- b. Tetesi dengan larutan *Crystal violet*, biarkan satu menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, kemudian keringkan.
- c. Tetesi dengan larutan *lugol's iodine*, biarkan 1 menit, dicuci menggunakan air yang mengalir lalu dikeringkan.
- d. Kemudian preparat dilunturkan dengan larutan peluntur yaitu *alkohol* 96% selama 10 detik, cuci menggunakan air yang mengalir, selanjutnya dikeringkan.
- e. Beri larutan cat penutup cat lawan yaitu *safranin* selama 1 menit, cuci menggunakan air yang mengalir, kemudian keringkan diudara.
- f. Amati preparat dengan perbesaran lensa *obyektif* 100x menggunakan oil imersi. Hasil akan diketahui bakteri Gram (+) berwarna *violet* dan bakteri Gram (-) berwarna merah.

7. Prosedur Uji Biokimia TSIA

Ambil koloni pada isolat media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) menggunakan ose jarum yang steril. Kemudian tanamkan ke media TSIA dengan cara posisi ose ditusuk sampai dasar (butt) dan bagian yang miring (slant) digoreskan dengan metode zig-zag pada permukaan. Tutup rapat dengan kapas lalu masukkan ke dalam inkubator padasuhu 37°C selama 24 jam

3. Pasca Analitik

- a. Positif terdapat bakteri *Salmonella sp* pada media *Brain Hearth Infusion Broth* (BHIB) apabila terjadi kekeruhan pada media. Negatif *Salmonella sp* bila tidak terjadi kekeruhan pada media.
- b. Positif terdapat bakteri *Salmonella sp* pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) ditandai dengan adanya koloni yang berwarna hitam, bulat, dan smooth. Negatif bila tidak adanya koloni berwarna hitam pada media

- c. Pada pewarnaan gram jika merupakan bakteri gram-negatif, bakteri *Salmonella sp* akan terlihat berbentuk batang dibawah mikroskop dengan lapang pandang berwarna merah
- d. TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)
Hasil Positif *Salmonella sp* pada media TSIA yaitu jika media memberikan reaksi asam berwarna kuning pada bagian pangkal (butt) dan miring (slant) berwarna merah menunjukkan sifat alkalis (K), dan disertai dengan adanya H_2S dan gas.
 - a. Dokumentasi
 - b. Pencatatan dan pelaporan hasil.

F. Instrumen Penelitian

Data Instrumen pengambilan data dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Instrumen penelitian yang dibawah ke lokasi pengambilan sampel adalah instrumen consent (lembar persetujuan) dan logbook.
2. Instrumen penelitian yaitu alat penelitian yang digunakan di Laboratorium terdiri atas alat dan bahan yang telah disediakan atau persetujuan dari penanggung jawab laboratorium.

G. Jenis Data

1. Data primer

Data primer dalam penelitian ini adalah data yang diperoleh dari instrumen penelitian yang diperoleh langsung dari tempat penelitian.

2. Data Sekunder

Data sekunder diperoleh dari berbagai jurnal penelitian yang berhubungan dengan bakteri *Salmonella sp*.

H. Pengolahan Data

Setelah data terkumpul melalui proses diatas, dalam memudahkan penelitian maka dilanjutkan pada proses pengolahan data dengan langkah sebagai berikut :

- a. Coding adalah suatu kegiatan perubahan data ke bentuk kalimat atau huruf menjadi data atau angka dan bilangan.

- b. Tabulating adalah 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 dianalisis sampel feses balita mana yang teridentifikasi bakteri *Salmonella sp* pada feses balita.

I. Analisis Data

Hasil identifikasi Bakteri *Salmonella sp* pada *feses* balita yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif dengan pendekatan analisis laboratorik berdasarkan hasil dari identifikasi pada feses balita. Adapun data yang telah dikumpulkan kemudian ditabulasi dan dikelompokkan sesuai dengan kelompok data yang disajikan dalam bentuk tabel distribusi.

J. Penyajian Data

Hasil analisis data akan disajikan dalam bentuk tabel kemudian dinarasikan sehingga bisa memberikan kemudahan dalam menganalisa ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp* pada *feses* balita penderita diare Di Wilayah Pesisir Kecamatan Soropia.

K. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat beberapa etika penelitian yang harus diterapkan, antara lain :

1. *Informed consent*

Lembar persetujuan yang diberikan kepada responden yang akan diteliti yang memenuhi kriteria penelitian. Baik subjek menolak, maka peneliti tidak memaksa dan tetap menghormati hak-hak subjek.

2. *Anonymity* (Tanpa nama)

Dilakukan dengan cara tidak memberikan nama responden pada lembar alat ukur, hanya menuliskan kode pada lembar pengumpulan data.

3. *Confidentiality* (Kerahasiaan)

Menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah-masalah lainnya. Informasi yang dikumpulkan (Nama, alamat serta nomor telpon pasien atau responden) dijamin kerahasiaannya oleh

peneliti, hanya kelompok dan data tertentu yang akan dilaporkan pada hasil pemeriksaan.