

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Deskriptif* dengan pendekatan Analisis Laboratorik yaitu dengan menggambarkan atau mendeskripsikan suatu kejadian yang terjadi di suatu populasi tersebut secara nyata.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 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 yang meliputi beberapa desa yaitu desa Toronipa 9 sampel (29%), desa Bokori 3 sampel (10%), desa Bajo Indah 3 sampel (10%), desa Soropia 6 sampel (19%), desa tapulaga 5 sampel (16%), desa Waworaha 5 sampel (16%) dengan jumlah 32 balita.

2. Sampel

Sampel adalah bagian yang diambil dari keseluruhan objek yang diteliti dan dianggap mewakili karakter dari populasi (Notoatmodjo, 2002: 70). Sampel dalam penelitian ini adalah Balita yang berada di Wilayah Pesisir Kecamatan Soropia dengan rentan usia 0-65 bulan dengan bahan uji berupa feses. Adapun teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan *Purposive Sampling*. *Purposive Sampling* yaitu peneliti mempertimbangkan kriteria sampel untuk memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti dari karakteristik populasi (Ramadhani

Khija, ludovick Uttoh, 2015). Populasi yang ada yaitu terdapat 32 sampel feses balita yang berada di wilayah pesisir kecamatan soropia.

a) Kriteria Inklusi

- Anak Balita Umur 0-65 bulan yang berdomisili di Wilayah pesisir Kecamatan Soropia.
- Feses berkonsistensi lunak atau cair dan padat.
- Balita berjenis kelamin laki-laki dan perempuan
- Orang Tua Balita bersedia untuk ikut terlibat sebagai subjek dalam penelitian.

b) Kriteria Eksklusi

- Balita yang tidak memenuhi kriteria dalam penelitian
- Orang Tua Balita tidak bersedia untuk ikut terlibat sebagai subjek dalam penelitian.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data dimulai dari pengamatan (observasi), wawancara terhadap pasien, pengumpulan jurnal, studi literatur hingga Data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium secara langsung yaitu dengan 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 :

- a. Autoclave
- b. WaterBath
- c. Beaker Glass
- d. Bunsen
- e. Batang Pengaduk
- f. Cawan Petri

- g. Erlenmeyer
 - h. Inkubator
 - i. Korek Api
 - j. Ose Bulat dan Jarum
 - k. Pipet tetes
 - l. Pinset
 - m. Tabung reaksi
 - n. Timbangan digital
 - o. Spidol
- 2) Bahan (Media)
- a. Bahan Uji : Feses Balita
 - b. Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
 - c. Media SSA (*Salmonella Shigella Agar*)
 - d. Media TSIA
 - e. Oil imersi
 - f. Pot Sampel
 - g. Aquadest
 - h. Kapas
 - i. Objek Glass
 - j. Sarung Tangan
 - k. Masker
 - l. Kertas Label
- 3) Reagensia
- Pengecatan 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. Setelah itu memberikan surat persetujuan untuk ditanda tangani oleh orang tua subyek.
- c. Setelah itu dilakukan penjelasan pengambilan bahan pemeriksaan.
- d. Feses sampel yang diambil adalah feses segar yang ditampung secara langsung oleh orang tua subyek.
- e. Masing-masing orang tua subyek diberikan pot sampel feses untuk meletakkan feses dan disertai lembaran kertas yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor pot sampel feses.
- f. Selain nomor pot feses, kertas juga berisikan nama subyek, usia, jenis kelamin, data klinis yang terkait serta gambaran makroskopis feses.
- g. Pot sampel feses dikembalikan pada hari yang sama saat pemberian atau pada saat itu juga.
- h. Sampel dibawa ke laboratorium kurang dari delapan jam pengambilan.
- i. Sampel feses diisolasi langsung pada media BHIB untuk menumbuhkan bakteri.

j. Jika terjadi kekeruhan maka dilanjutkan dengan penanaman pada media selektif yaitu 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 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 kedalam tabung reaksi yang telah disterilkan.
- g. Cawan petrik yang telah terisi dengan larutan ditutup kemudian disterilkan kedalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- h. Setelah proses *sterilisasi* selesai, media didinginkan 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 di ukur pH dengan indikator pH $7,4 \pm 0,2$.
- c. Kemudian panaskan media dengan menggunakan *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.

2) Pembuatan Media TSIA

a) Pembuatan media TSIA

- 1) 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.
- 2) Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL dan larutkan dengan *aquadest* sebanyak 180 mL, dan ukur Ph dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. Kemudian dipanaskan sampai larut dengan baik.
- 3) Kemudian tuang media TSIA kedalam tabung reaksi, jangan sampai penuh sekitar 5 ml selanjutnya ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas aluminium.
- 4) 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.

4. Prosedur Penanaman Bakteri

1) Inokulasi dan Isolasi sampel *Feses* Balita Pada Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Cara kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- a) peralatan yang dipakai disiapkan dalam keadaan steril dan semua pekerjaan dilakukan secara aseptis.
- b) Sampel *Feses* Balita yang telah melalui proses pengenceran di ambil menggunakan ujung *Ose* dan di inokulasi pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) lalu di homogenkan.
- c) Diinkubasi media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37⁰C di inkubator.
- d) Jika terjadi kekeruhan pada Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), dilanjutkan pada media selektif yaitu media SSA.
- e) Jika tidak terjadi kekeruhan pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), tidak di lanjutkan Pada Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA).

2) Inokulasi dan Isolasi Bakteri Pada Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)

- a) Bakteri yang tersangka pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), Diambil dengan menggunakan ose yang sudah di fiksasi.
- b) Diisolasi pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dengan cara digoreskan.
- c) Diinkubasi Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37⁰C di *incubator*.

- d) Amati ciri koloni yang tumbuh pada Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) kemudian lakukan pewarnaan gram.
 - e) Jika tidak ada pertumbuhan koloni pada Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) maka tidak dilakukan pada pewarnaan gram.
- 3) Identifikasi Bakteri *Shigella sp*

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

1) Prosedur Pewarnaan Gram

- 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.

2) Prosedur Uji Biokimia

a. Uji Biokimia Media 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 pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Pasca Analitik

- a. Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) merupakan media penyubur untuk berbagai macam bakteri. (+) Positif *Shigella sp* apabila terjadi kekeruhan pada media. (-) Negatif *Shigella sp* bila tidak terjadi kekeruhan pada media.
- b. Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) (+) positif pada media jika terdapat pertumbuhan koloni dengan ciri koloni sedang, tidak berwarna bening dengan inti hitam, permukaan cembung dengan tepian halus, smooth. Hasil (-) negatif jika tidak terdapat pertumbuhan koloni sedang tidak berwarna bening dengan inti hitam, permukaan cembung dengan tepian halus, smooth.
- c. Pewarnaan Gram jika merupakan bakteri Gram-negatif, bakteri *Shigella sp* pada media SSA dengan bentuk *cocobasil*, susunan tunggal dan berwarna merah.
- d. Uji Biokimia (Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar) (+) Positif shigella sp pada media TSIA jika media memberikan reaksi asam (A) berwarna kuning pada bagian pangkal (butt) dan miring (slant) berwarna merah menunjukkan sifat alkalis (K). Hal menandakan bahwa bakteri hanya dapat menghasilkan glukosa namun tidak memproduksi gas dan tidak menghasilkan H₂S.

4. Dokumentasi.

5. Pencatatan dan pelaporan hasil.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan sebagai penunjang dalam penelitian ini yaitu lembar observasi, *Informed Consent* dan hasil pemeriksaan.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer adalah dalam data yang diperoleh secara langsung dari lapangan melalui instrumen pengumpulan data yang digunakan berkaitan dengan objek yang diteliti.

2. Data Sekunder

Data Sekunder diperoleh dari berbagai jurnal penelitian yang berhubungan dengan bakteri *Shigella sp* dan berbagai buku literatur tentang bakteri yang berada pada saluran pencernaan.

H. Pengolahan Data

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

- a. Coding adalah suatu kegiatan pengubahan 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 *Shigella sp* pada *Feses Balita*.

I. Analisis Data

Deskriptif dengan pendekatan Analisis Laboratorik berdasarkan hasil dari identifikasi pada feses balita. Analisis *Deskriptif* Laboratorik dilakukan mengidentifikasi bakteri *Shigella sp* pada *Feses Balita*, kemudian menentukan *spesies* yang ada pada sampel tersebut.

J. Penyajian Data

Hasil analisis data akan disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian di narasikan sehingga bisa memberikan kemudahan dalam menganalisa ada atau tidak adanya bakteri *Shigella sp* pada Feses Balita 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.