

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu *Deskriptif Observasional* dimana penelitian ini akan menggambarkan keberadaan bakteri *Klebsiella sp* pada sampel pus luka penderita diabetes di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengambilan sampel penelitian ini yaitu di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara. Tempat pemeriksaan sampel dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 14 maret - 30 Mei 2023.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah luka penderita diabetes di BLUD Bahteramas Kota Kendari dengan sebanyak 4 orang sesuai dari hasil observasi.

2. Bahan Uji

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah pus (nanah) luka diabetes melitus yang diambil secara swab. Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Accidental Sampling* yaitu teknik pengambilan sampel berdasarkan jumlah kejadian yang ditemui pada saat penelitian ini dilakukan.

D. Prosedur Pengumpulan Data

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

yaitu teknik pengambilan sampel berdasarkan jumlah kejadian yang ditemui pada saat penelitian dilakukan.

1. Data primer yang diperoleh dari hasil wawancara langsung dilapangan yang bersumber dari logbook dan pemeriksaan bakteri *Klebsiella sp* pada luka diabetes di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara.
2. Data sekunder yang diperoleh dari data rekam medis di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara, jurnal penelitian, buku literature yang berhubungan dengan bakteri pada luka diabetes.

E. Prosedur Penelitian

Proses penelitian pemeriksaan laboratorium yaitu dengan tahapan pra analitik, analitik, dan pasca analitik.

1. Pra Analitik

1. Persiapan alat dan bahan.

1) Alat :

Alat yang digunakan :

- a. Autoclave
- b. Batang pengaduk
- c. Botol semprot
- d. Cawan petri
- e. Erlenmeyer
- f. Incubator
- g. Jembatan Pewarnaan
- h. Kaki tiga
- i. Labu erlenmeyer
- j. Mikroskop
- k. Objek glass
- l. Ose lurus
- m. Oven
- n. Ose bulat
- o. Pipet volume
- p. Pipet tetes

- q. Tabung reaksi
 - r. Timbangan digital
 - s. Waterbath
- 2) Bahan :
- a. Sampel pus ulkus
 - b. Aquadest
 - c. Kasa steril
 - d. Kapas
 - e. Media Transport Swab
 - f. Media BHIB
 - g. Media *Mac Conkey Agar*
 - h. Media *Indol, Metil Red, Voges Prouskauer, Citrat (IMVIC)*
 - i. Media TSIA
 - j. NaCl
 - k. Reagen *Kovac*
 - l. Reagen *Methyl Red*
 - m. Reagen *alpha-naftol 5%*
 - n. Reagen KOH 40%
 - o. Oil imersi
 - p. Sarung tangan
 - q. Spirtus
 - r. Kertas indikator pH
 - s. Kertas label
 - t. Alkohol 96%
 - u. Gentient violet
 - v. Lugol
 - w. Fuchsin

2. Analitik

a. Prosedur Persiapan

1. Sterilisasi Alat

- a. Peralatan yang akan digunakan dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan.
- b. Bungkus dengan kertas setiap peralatan.
- c. Lalu sterilisasi menggunakan oven pada temperature 180°C dalam waktu 1 jam.

2. Proses Pengambilan Sampel

- a. Memberi penjelasan pada pasien mengenai tindakan yang akan dilakukan dan memberikan lembar *Informed Consent* jika disetujui lakukan pengambilan sampel.
- b. Luka dibersihkan dengan kain kasa yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lapisan eksudat yang mengering atau kotoran.
- c. Buka kultur transport swab dari pembungkusnya kemudian usapkan bagian cotton swab pada luka tanpa menyentuh bagian tepi luka.
- d. Kemudian masukkan cotton swab tersebut ke dalam media amies dan tutup tabung dengan erat.
- e. Cantumkan identitas nama pasien dengan kertas label.
- f. Bawa ke Laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.

3. Pembuatan Media

1) Pembuatan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)

- a. Penimbangan reagen/media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 37 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 30 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 1,11 gram.

- b. Dimasukkan kedalam erlenmeyer 50 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 30 mL, dan ukur pH dengan indikator 7,4. Kemudian dipanaskan menggunakan waterbath sampai larut dengan baik.
 - c. Kemudian media dipipet menggunakan pipet ukur/spoit sebanyak 5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. Pembuatan Media *Mac Conkey Agar* (MCA)
- 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 52 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 90 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 4,68 gram.
 - b. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 90 mL, dan ukur pH dengan 7,4 kemudian dipanaskan (Homogenkan) sampai larut dengan baik menggunakan waterbath.
 - c. Setelah homogen gelas erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah itu dikeluarkan dan di dinginkan.
 - d. Selanjutnya buka kapas yang menutupi mulut erlenmeyer dan panaskan mulut erlenmeyer diatas api spirtus.
 - e. Kemudian lakukan penuangan media pada cawan petri sebanyak 20 ml dan diamkan sampai mendingin dan menjadi agar.

3. Pembuatan media *Indol, Metil Red, Voges Prouskauer, Citrat* (IMViC)

a. Media *Sulfide Indol Motility* (SIM)

Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 36,23 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 30 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 1,086 gram. lalu dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi 30 mL akuades dan ukur pH dengan 7,4 Panaskan dengan waterbath selama 10 menit. Setelah itu tuang sebanyak 5 mL pada tabung reaksi. Sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Tunggu hingga menjadi agar

b. Media *Methyl Red* dan *Voges-Proskauer* (MR-VP)

Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 17,0 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 30 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 0,51 gram. lalu masukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi 30 mL akuades dan ukur pH dengan 7,4 Panaskan dengan waterbath pada suhu 150°C selama 10 menit. Setelah itu tuang sebanyak 5 mL pada tabung reaksi. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Media *Simmon Citrate Agar* (*Citrate*)

Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan/volume yang akan dibuat dengan berpedoman pada cara pembuatan media yang tertera pada botol media. Pada botol media tertera 24,28 gr dalam pengenceran 1000 ml, sementara yang akan dibuat 30 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 0,728 gram. lalu masukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi 30 mL akuades dan ukur

pH dengan 7,4. Panaskan dengan waterbath pada suhu 150°C selama 15 menit. Setelah itu tuang sebanyak 5 mL pada tabung reaksi. Sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Tunggu hingga menjadi agar

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 30 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 1,935 gram.
- b. Dimasukkan kedalam erlenmeyer 50 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 30 mL, dan ukur pH dengan indikator 7,4. Kemudian dipanaskan menggunakan waterbath 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 tunggu hingga menjadi agar.

4. Prosedur Inokulasi Sampel Pada Media Biakan

a. Prosedur Kerja Inokulasi Bakteri Pada Media BHIB

Sampel pus ulkus diabetes di inokulasi pada media BHIB dengan perbandingan 5:1 dimana 5 ml untuk media BHIB dan 1 ose untuk sampel ulkus diabetes, kemudian diinkubasi media BHIB tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Jika terjadi kekeruhan pada media BHIB, dilanjutkan pada media MCA.

- b. **Prosedur Kerja Inokulasi Bakteri pada media MCA**
Bakteri yang terdapat di media BHIB, diambil dengan menggunakan ose yang sudah di fiksasi lalu isolasi ke dalam *Mac Conkey Agar* dengan menggoreskan diatas media secara zig-zag. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, jika ada pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella sp* lakukan pewarnaan gram.
5. **Pewarnaan gram**
 - a. Meneteskan NaCl pada kaca objek untuk membuat suspensi .
 - b. Pijarkan ose pada bunsen dan tunggu hingga dingin.
 - c. Diambil koloni pada media MCA kemudian diletakkan pada objek gelas kemudian diratakan dengan ose.
 - d. Lalu dikeringkan dengan cara fiksasi diatas api spirtus sebanyak 3 kali dan diletakkan diatas jembatan pewarnaan gram.
 - e. Genangi sediaan dengan gentient violet, diamkan selama 1 menit lalu sediaan dibilas dengan air mengalir secara perlahan.
 - f. Genangi sediaan dengan lugol sampai menutupi permukaan sediaan. Diamkan selama 1 menit.
 - g. Kemudian genangi dengan alkohol 96% sampai warna gentient violet hilang selama 5-10 detik.
 - h. Cuci sediaan dengan air mengalir secara perlahan
 - i. Genangi dengan larutan fuchsin selama 30 detik, lalu cuci dengan air.
 - j. Keringkan dan periksa di bawah mikroskop perbesaran 100x menggunakan oil imersi.
 6. **Inokulasi bakteri pada uji *Indol, Methyl Red, Voge's Prouskauer, Simmons Citrat* (IMVIC)**
 - a. **Media *Sulfide Indol Motility* (SIM)**
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. Setelah inkubasi kultur ditetesi dengan 3 tetes reagen kovac's perlahan pada dinding tabung hingga terlihat garis pemisah antara media dan reagen.

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

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 menaik turunkan ose hingga koloni tercampur dengan larutan. Letakkan media pada inkubator selama 1x24 jam. Setelah inkubasi pada media *Methyl Red* tambahkan 3 tetes reagen methyl red sedangkan pada media *Voge's-Proskauer* tambahkan 10 tetes reagen KOH dan 15 tetes alfanaftol. Lalu kocok tabung sehingga kaldu terlihat berbuih. Hasil reaksi dapat terlihat paling lambat 30 menit.

c. Media *Simmon Citrate Agar* (*Citrate*)

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 citrate (bagian slant media). Lalu masukkan media pada inkubator selama 1x24 jam.

7. Inokulasi Uji Biokimia Pada Media TSIA

Ambil koloni pada isolat media MCA 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 1x24 jam.

3. Pasca Analitik

- a. Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
Terjadi pertumbuhan bakteri jika terjadi kekeruhan pada media.
- b. Media *Mac Conkey Agar* (MCA)
Adanya pertumbuhan koloni *Klebsiella sp* yaitu berwarna merah muda sampai merah bata , bulat besar, mukoid (berlendir seperti benang), cembung, meragikan laktosa.
- c. Pewarnaan Gram
Pada pewarnaan gram jika merupakan bakteri gram negatif, bakteri *Klebsiella sp* akan terlihat dibawah mikroskop dengan lapangan pandang berwarna merah dan bentuk batang (basil) pendek, tidak bergerak.
- d. Uji Biokimia IMViC
 - 1) Media *Sulfide Indol Motility* (SIM)
Hasil uji indol dengan tidak terbentuk cicin warna merah pada media, negatif motilitas dengan tidak terbentuknya gambaran awan pada daerah tusukkan osse, negatif H₂S ditandai dengan tidak berubah warna menjadi hitam.
 - 2) Media *Methyl Red* dan *Voge 's-Proskauer* (MR-VP)
Hasil pada uji MR adalah tidak terbentuknya warna merah pada medium setelah ditambahkan reagen methyl red sedangkan untuk uji VP dan penambahan reagen KOH 40% dan alfa-naftol ditunjukkan dengan terjadi perubahan warna media menjadi merah setelah penambahan larutan indikator.
 - 3) Media *Simmon Citrate Agar* (Sitrak)
Hasil positif pada uji sitrat adalah adanya perubahan warna media menjadi biru.
- e. Uji Biokimia TSIA
Hasil positif bakteri memfermentasikan karbohidrat ditandai dengan Acid/Acid bagian dasar (butt) dan lereng (slant) perubahan warna menjadi kuning, disertai dengan gas, tidak menghasilkan H₂S.

F. Instrument Penelitian

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

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 diperoleh dari berbagai jurnal penelitian dan buku literatur yang berhubungan dengan bakteri pada luka diabetes melitus serta data rekam medis yang diambil dari tempat penelitian di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara.

H. Pengolahan Data

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

1. Coding adalah memberikan kode pada sampel luka penderita diabetes yang diteliti untuk memudahkan dalam menganalisis sampel sesuai dari data yang terkumpul disetiap instrument penelitian.
2. 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 luka penderita diabetes mana yang teridentifikasi bakteri *Klebsiella sp* pada luka penderita diabetes.

I. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan dengan menggunakan analisis *Deskriptif Observasional*. Analisis data merupakan analisis yang dipakai untuk menganalisis data dengan menggambarkan data yang telah ada dikumpulkan seadanya dari hasil penelitian mulai dari tahap isolasi dan identifikasi dengan

melihat ada tidaknya bakteri *Klebsiella sp* pada luka diabetes, kemudian ditabulasi dalam bentuk tabel.

J. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini yaitu data yang didapatkan dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dinarasikan sehingga bisa memberikan kemudahan dalam menganalisa ada atau tidak adanya bakteri *Klebsiella sp* pada Luka Diabetes .

K. Etika Penelitian

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

1. *Informed Consent*

Lembar persetujuan ini diberikan kepada responden yang akan diteliti, bila subjek menolak maka peneliti tidak memaksa dan tetap menghormati hak- hak subjek.

2. *Anonymity* (Tanpa nama)

Dilakukan dengan cara tidak memberikan nama responden untuk menjaga kerahasiaan tetapi akan memberikan kode pada lembar pengumpulan data.

3. *Confidentiality* (Kerahasiaan)

Menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah-masalah lainnya. Informasi yang dikumpulkan (Nama, alamat, umur, tanggal lahir pasien atau responden) dijamin kerahasiaannya oleh peneliti, hanya kelompok dan data tertentu yang akan dilaporkan pada hasil pemeriksaan.