

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Dalam penelitian ini, Jenis Penelitian yang digunakan adalah deskriptif dengan pendekatan analisis laboratorik.

#### **A. 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.

#### **B. 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 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.

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 balita tidak bersedia untuk ikut terlibat sebagai subjek dalam penelitian.

**C. 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.

**D. Prosedur Kerja**

**1. Pra Analitik**

a. Persiapan alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah :

- a. Autoclave
- b. Waterbath
- c. Beaker glas
- d. Box Styrofoam
- e. Bunsen
- f. Batang pengaduk
- g. Cawan petri
- h. Erlenmeyer
- i. Inkubator
- j. Korek Api
- k. Ose bulat dan jarum
- l. Pipet tetes
- m. Pinset
- n. Tabung reaksi
- o. Timbangan digital
- p. Spidol

b. Bahan yang digunakan:

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

c. Reagensia

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

**2. Analitik**

a. 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  $121^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 15 menit.

## b. Preparasi Sampel

1. Memberikan penjelasan kepada responden mengenai Tindakan yang akan dilakukan.
2. Setelah itu memberikan surat persetujuan untuk ditanda tangani oleh orang tua subyek.
3. Setelah itu dilakukan penjelasan pengambilan bahan pemeriksaan.
4. Feses sampel yang diambil adalah feses segar yang ditampung secara langsung oleh orang tua subyek.
5. Masing-masing orang tua subyek diberikan pot sampel feses untuk meletakkan feses dan disertai lemparan kertas yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor pot sampel feses.
6. Selain nomor pot feses, kertas juga berisikan nama subyek, usia, jenis kelamin, data klinis yang terkait serta gambaran makroskopis feses.
7. Pot sampel feses dikembalikan pada hari yang sama saat pemberian atau pada saat itu juga.
8. Sampel dibawa ke laboratorium kurang dari delapan jam pengambilan.
9. Sampel feses diisolasi langsung pada media BHIB untuk menumbuhkan bakteri.
10. Jika terjadi kekeruhan maka dilanjutkan dengan penanaman pada media selektif yaitu media EMBA.

## c. 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 cawan Petrik yang telah disterilkan.
  - g. Cawan Petrik yang telah terisi dengan larutan ditutup dengan kapas kemudian disterilkan kedalam *autoclave* pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
  - h. Setelah proses *sterilisasi* selesai, media didinginkan lalu disimpan dilemari es.
2. Pembuatan Media EMBA (*Eosin Methylen Blue Agar*)
- a. Siapkan alat dan bahan
  - b. Timbang reagen EMBA sebanyak 4,2 gram yang diletakkan di dalam cawan porselin dan ditimbang menggunakan timbangan digital.
  - c. Lalu dilarutkan kedalam Erlenmeyer menggunakan aquades sebanyak 120 mL.
  - d. Panaskan media dengan waterbath sampai larut dengan baik Media dipanaskan jangan sampai mendidih, setelah larut sempurna media didinginkan lalu diukur pH nya dengan indikator pH  $7,4 \pm 0,2$
  - e. Kemudian tutup Erlenmeyer yang berisi media EMBA menggunakan kapas, lalu disterilisasi media didalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$
  - f. Setelah disterilisasi tuang media kedalam cawan petri yang telah disterilkan, caranya buku tutup cawan petri seminim mungkin untuk menghindari atau meminimalisasi terjadinya kontaminasi

lalu tuang larutan hingga menutupi permukaan cawan petri, tetapi jangan terlalu tipis maupun terlalu tebal. Kira kira sebanyak 20 mL

- g. Setelah penuangan selesai biarkan media tersebut sampai dingin dan padat. Setelah itu media dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam lemari es.

### 3. 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 indikator  $7,4 \pm 0,2$ . 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  $121^{\circ}\text{C}$ . Setelah sudah disterilisasi dikeluarkan dari autoklaf untuk didiamkan dan dimiringkan lalu masukkan kedalam kulkas.

#### d. Prosedur Penanaman Bakteri

- 1. Isolasi sampel feses balita pada media *Brain Hearth Infussion 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 diambil menggunakan ujung ose dan diinokulasi pada media

*Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) lalu dihomogenkan.

- c. Diinkubasi media BHIB tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C diinkubator
  - d. Jika terjadi kekeruhan pada media BHIB maka dilanjutkan pada media EMBA
  - e. Jika tidak terjadi kekeruhan pada media BHIB maka tidak dilanjutkan pada media EMBA.
2. Inokulasi bakteri pada media EMBA
    - a. Bakteri yang tersangka pada media BHIB diambil dengan menggunakan ose yang sudah difiksasi
    - b. Diisolasi pada media EMBA dengan cara digoreskan.
    - c. Diinkubasi media EMBA tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C di incubator
    - d. Amati ciri koloni yang tumbuh pada media EMBA kemudian lakukan pewarnaan gram.
    - e. Jika tidak ada pertumbuhan koloni pada media EMBA maka tidak dilakukan pada pewarnaan gram.
  - e. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

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 EMBA, letakkan diatas *objek glas*
  - b. Tetesi dengan larutan *Crystal violet*, biarkan satu menit, selanjutnya dicuci menggunakan air yang mengalir lalu dikeringkan.
  - c. Tetesi dengan larutan *lugol's iodine*, biarkan satu menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, kemudian keringkan.
  - d. Kemudian preparat dilunturkan dengan larutan peluntur yaitu alkohol 96% selama 10 detik, cuci menggunakan air yang mengalir, selanjutnya keringkan.

- 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.

### 3. Prosedur Uji Biokimia TSIA

Ambil koloni pada isolat media *Eosin methylene blue Agar* (EMBA) 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 Hearth Infusion Broth* (BHIB) merupakan media penyubur untuk berbagai macam bakteri. (+) Positif *Escherichia coli* apabila terjadi kekeruhan pada media. (-) Negatif *Escherichia coli* bila tidak terjadi kekeruhan pada media.
- b. Positif terdapat bakteri *Escherichia coli* pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) ditandai dengan adanya koloni yang berwarna hijau metalik pada media, negatif *Escherichia coli* bila tidak adanya koloni berwarna hijau metalik pada media.
- c. Pada pewarnaan gram jika merupakan bakteri Gram-negatif, bakteri *Escherichia coli* akan terlihat dibawah mikroskop dengan lapang pandang berwarna merah dan berbentuk batang (*kokobasil*).
- d. TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) Hasil pengamatan pada media TSIA menandakan adanya bakteri *Escehrichia coli* pada sampel feses. *Triple sugar iron agar* (TSIA) positif jika media memberikan reaksi asam berwarna Kuning/Acid pada bagian pangkal (*butt*) dan pada posisi Miring (*Slant*) Berwarna



Kuning/Acid pada bagias atas serta terbentuknya gas dan tidak adanya H<sub>2</sub>S.

#### **E. Instrumen Penelitian**

Data Instrument pengambilan data dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

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

#### **F. Jenis Data**

1. Data Primer

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

2. Data Sekunder

Data sekunder diperoleh dari berbagai jurnal penelitian yang berhubungan dengan bakteri *Escherichia coli*.

#### **G. 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 perubahan data kebentuk kalimat atau huruf menjadi data atau angka dan bilangan.
- b. *Tabulating* adalah membuat tabel data yang sesuai dengan tujuan penelitian, digunakan agar mempermudah proses analisis hasil. Dalam penelitian ini hasil data disajikan dalam bentuk tabel yang akan disesuaikan dengan variable yang dipilih, sehingga dapat dianalisis sampel Feses balita mana yang teridentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada feses balita.

#### **H. Analisis Data**

Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* 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.

### **I. Penyajian Data**

Hasil analisis data akan disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dinarasikan sehingga bisa memberikan kemudahan dalam menganalisa ada atau tidak adanya bakteri *Escherichia coli* pada feses balita di wilayah pesisir Kecamatan Soropia.

### **J. Etika Penelitian**

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

#### *a. 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 baik-baik subjek.

#### *b. Anonymity (Tanpa nama)*

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

#### *c. Confidentiality (Kerahasiaan)*

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