

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat *Deskriptif Observasional*, dimana penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menggambarkan keberadaan suatu bakteri *Streptococcus sp.* Pada sampel pus (nanah) luka penderita diabetes di BLUD Bahteramas Kota Kendari.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat pengambilan sampel penelitian ini yaitu di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara Bahteramas. 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 ciri-ciri gangren 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 penderita diabetes yang dengan ciri-ciri ulkus yang sudah ditahap gangren 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 yang bersumber dari logbook dan pemeriksaan bakteri *Streptococcus sp* pada luka diabetes di BLUD Bahteramas Kota Kendari.
2. Data sekunder yang diperoleh dari data rekam medis di BLUD Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara Bahteramas, jurnal penelitian, buku literatur yang berhubungan dengan bakteri pada luka penderita diabetes.

E. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

a. Persiapan Alat Dan Bahan

1) Alat yang digunakan:

- a) Gelas Ukur
- b) Gelas Beaker
- c) Cawan Petri
- d) Tabung Reaksi
- e) Objek Glass
- f) Timbangan Digital
- g) Mikroskop
- h) Jarum Ose
- i) Erlenmeyer
- j) Lampu Spiritus
- k) Inkubator
- l) Autoclave
- m) Oven
- n) Batang Pengaduk
- o) pH Meter
- p) Pipet Tetes
- q) Jembatan Pewarnaan

2) Bahan yang digunakan:

- a. Sampel pus (nanah) ulkus diabetes.

- b. Media *Blood Agar Plate*.
 - c. Media *Brain-heart Infusion Broth*
 - d. Media TSIA
 - e. H₂O₂3%
 - f. Aquadest.
 - g. Kristal Violet.
 - h. Larutan Lugol
 - i. Safranin
 - j. Alkohol 96%
 - k. Spiritus
 - l. Oil Imersi
 - m. Kertas Label
- 3) Sterilisasi alat
- Alat-alat yang akan digunakan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 1 jam.
- 4) Proses Pengambilan Sampel
- a. Pasien diberi penjelasan mengenai tindakan yang akan dilakukan dan memberikan lembar *Informed Consent* jika disetujui lakukan pengambilan sampel.
 - b. Bersihkan luka dengan kain kasa yang telah dibasahi dengan NaCL fisiologis sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lapisan eksudat yang mengering atau kotoran.
 - c. Buka kultur swab dari pembungkusnya kemudian usapkan bagian cotton swab pada luka atau ulkus tanpa menyentuh bagian tepi luka atau ulkus.
 - d. Kemudian masukkan cotton swab tersebut ke dalam media amies dan tutup tabung dengan erat.
 - e. Cantumkan identitas nama pasien dengan kertas label.
 - f. Bawah ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.
- 5) 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 25 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 0,92 gram.

- b. Dimasukkan kedalam erlenmeyer 50 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 25 mL, dan ukur pH dengan indikator $7,4 \pm 0,2$. Kemudian dipanaskan sampai larut dengan waterbath
 - 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.
- 6) Pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP).
- a) Timbang media BAP sebanyak 4 gr, kemudian masukkan ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi 100 ml aquades.
 - b) Ukur pH dengan indikator 6,8
 - c) Kemudian panaskan menggunakan waterbath hingga media larut dengan baik.
 - d) Lakukan steriliisasi media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - e) Dinginkan media pada suhu $45-50^{\circ}\text{C}$, setelah dingin tambahkan 5% darah O kedalam tabung Erlenmeyer dengan perlahan lewat dinding tabung dan homogenkan.
 - f) Tuang media dari Erlenmeyer ke cawan petri steril dengan volume tertentu, ratakan dengan membentuk pola angka delapan secara perlahan.
 - g) Tuang sampai media memadat dan media siap pakai.

2. Analitik

- a. Isolasi sampel pada media *Brain-heart Infusion Broth* (BHIB). Adapun prosedur kerjanya yaitu sebagai berikut :
 - 1) Siapkan alat dan bahan yang telah disterilkan terlebih dahulu.
 - 2) Sampel pus diambil dengan menggunakan swab steril dan diisolasi

pada media *Brain-heart Infusion Broth* (BHIB).

- 3) Inkubasi media tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C pada inkubator.
 - 4) Jika terjadi kekeruhan pada media maka dilanjutkan dengan inokulasi pada media selektif *Blood Agar Plate* (BAP).
- b. Isolasi bakteri pada media selektif *Blood Agar Plate* (BAP). Adapun prosedur kerjanya yaitu sebagai berikut:
- 1) Bakteri yang telah tumbuh pada media BHIB, diambil menggunakan ose yang sudah difiksasi diatas api bunsen.
 - 2) Kemudian diisolasi pada media BAP dengan cara digoreskan.
 - 3) Selanjutnya media tersebut diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator.
 - 4) Amati ciri-ciri koloni tumbuh pada media BAP, jika tidak ada pertumbuhan koloni pada media maka tidak dilanjutkan pada tahap pewarnaan gram.
- c. Identifikasi Bakteri
- 1) Pewarnaan Gram

Setelah inkubasi terbentuk koloni-koloni mikroorganisme yang berbeda jenis. Kemudian diisolasi dan diidentifikasi dengan cara pewarnaan gram.

- a. Sediaan yang telah kering difiksasi dan diletakkan diatas jembatan pewarnaan.
- b. Cat dengan larutan kontrol gentian violet selama 1 menit.
- c. Zat warna dibuang, kemudian dicuci dengan ai mengalir.
- d. Genangi dengan lugol selama 1 menit.
- e. Cuci dengan air.
- f. Genangi dengan alkohol 96% sampai semua zat warna hilang
- g. Sediaan dicuci dengan air mengalir.
- h. Genangi dengan air dan keringkan, kemudian periksa dibawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100× dengan menggunakan oil imersi.

2) Uji 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 25 ml sehingga bahan yang akan ditimbang 1,613 gram.
- b. Dimasukkan kedalam erlenmeyer 50 mL dan larutkan dengan aquadest sebanyak 25 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 autoclav 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 hingga menjadi agar.

3) Uji Biokimia Media TSIA

Ambil koloni pada isolat media BAP 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.

4) Uji Katalase

- a. Satu tetes larutan H_2O_2 3% (suhu reagen dengan suhu ruangan) diletakkan diatas kaca objek.
- b. Dengan ose jarum, koloni bakteri diambil dicampurkan dengan reagen diatas kaca objek.
- c. Amati hasil yang akan terjadi.

3. Pasca Analitik

1. Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
 - a) Terjadi pertumbuhan bakteri jika terjadi kekeruhan.
 - b) Tidak adanya pertumbuhan bakteri jika tidak terjadi kekeruhan.
2. Media *Blood Agar Plate* (BAP)
 - a) Adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus sp* dengan morfologi berwarna ungu, bulat
 - b) Tidak adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus sp* pada media *Blood Agar Plate*
3. Pewarnaan Gram

Pada pewarnaan gram jika merupakan bakteri gram positif, bakteri *Streptococcus sp* akan terlihat dibawah mikroskop dengan lapang pandang berwarna ungu, bulat (coccus) berdiameter 0,5 – 1,0 mm dengan bentuk sedikit cembung, jernih dan membentuk zona hemolisis.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian 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 isolasi bakteri.
2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari berbagai jurnal penelitian yang berhubungan dengan bakteri *Streptococcus sp* yang berada pada luka diabetes melitus. Serta data rekam medis yang diambil dari tempat penelitian di BLUD Bahtermas Kota Kendari.

H. Pengolahan Data

Data yang dikumpulkan akan diolah dengan langkah-langkah 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 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 *Streptococcus sp* pada luka diabetes.

I. Analisa Data

Data yang diperoleh berupa hasil analisis dengan menggambarkan keberadaan bakteri *Streptococcus sp* secara *Deskriptif Observasi* yaitu melalui hasil pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan metode isolasi dan identifikasi bakteri kemudian dibuat 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 hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dinarasikan sehingga bisa memberikan kemudahan dalam menganalisa ada atau tidak adanya bakteri *Streptococcus 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 yang memenuhi kriteria inklusi dan disertai judul penelitian dan manfaat

penelitian, bila subjek menolak maka penelitian tidak akan memaksa kehendak dan tetap menghormati hak-hak subjek.

2. *Anonymity* (Tanpa Nama)

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

3. *Confidentiality*

Kerahasiaan informasi responden dijamin oleh peneliti serta hanya kelompok data tertentu yang akan dilaporkan sebagai hasil penelitian.