

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi analitik observasional dengan desain cross sectional, yang bertujuan mengevaluasi tingkat sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Proses penelitian dilakukan dengan mengidentifikasi keberadaan *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* pada sampel ulkus pasien diabetes mellitus, kemudian dilanjutkan dengan pengujian sensitivitas bakteri tersebut.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian dilaksanakan pada periode Februari hingga Maret 2025 di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* yang didapatkan dari hasil isolasi sampel ulkus pasien diabetes mellitus di Rumah Perawatan luka diabetes Solo.

2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 10 sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* yang berasal dari pus ulkus pasien Diabetes Mellitus.

a. Inklusi

Penderita DM dengan Ulkus Kaki. Ulkus dengan *grade* 1 dan 2 menurut *Wagner Classification*. Penderita atau keluarga memberikan persetujuan untuk dilakukan penelitian secara tertulis.

b. Eksklusi

Penderita DM tidak dengan Ulkus Kaki atau Penderita DM dengan Ulkus kaki yang sudah mengering (tanpa pus). Penderita atau keluarga tidak memberikan persetujuan untuk dilakukan penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

- a. Variabel utama pada penelitian ini adalah keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* yang diperoleh dari sampel ulkus pasien diabetes mellitus.
- b. Variabel utama lainnya adalah ukuran diameter zona hambat antibiotik terhadap isolat *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* dari sampel pus ulkus pasien diabetes mellitus.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama dalam penelitian ini berdasarkan peran dalam penelitian dibagi menjadi bentuk independen dan dependen. Variabel bebas (independen) dalam penelitian ini adalah antibiotik Vankomisin, Tetrasiklin, Ciprofloxasin, Ampisilin. Variabel terikat (dependen) dalam penelitian ini adalah hasil sensitivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* terhadap antibiotik.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

- a. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Staphylococcus aureus* dari sampel ulkus pasien diabetes Mellitus ditumbuhkan pada media padat dan media cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu *Vogel Jhonson Agar* (VJA) sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- b. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Proteus mirabilis* dari sampel ulkus pasien diabetes mellitus ditumbuhkan pada media padat dan cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu *Endo Agar* (EA) sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- c. Uji sensitivitas adalah uji kepekaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* terhadap beberapa antibiotik menggunakan metode difusi cakram (Kirby – Bauer) yang dapat dilihat dari diameter zona hambat kemudian dibandingkan dengan standar diameter zona haambat yang sudah ditetapkan oleh CLSI (*Clinical Laaboratory Standars Institute*) dan diukur dalam skala rasio dengan satuan milimeter.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Tabung reaksi, cawan petri, beaker glass, kapas lidi steril, objek glass, ose bulat, ose jarum, pembakar spirtus, inkubator, inkas atau *Bio Safety cabinet*, autoklaf, oven, spatel, mikroskop, pinset, korek, rak tabung reaksi, rak pewarnaan, pipet tetes, neraca analitik, kapas, koran, handscoon, masker, jas laboratorium.

2. Bahan

- a. Sampel ulkus pasien Diabetes Mellitus
- b. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- c. Media *Endo Agar* (EA)
- d. Media *Vogel Jhonson Agar* (VJA)
- e. Media *Nutrient Agar* (NA)
- f. Media SIM, KIA, LIA, Citrat
- g. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- h. Gram A berisi Pewarna *Kristal violet*
- i. Gram B berisi larutan lugol *Iodine*
- j. Gram C berisi larutan Alkohol – aseton
- k. Gram D berisi Pewarna Safranin
- l. Hidrogen peroksid 3%
- m. NaCl fisiologis steril
- n. Plasma citrat
- o. Disk antibiotik Vankomicin, Tetrasiklin, Ciprofloxasin, Ampisilin.

F. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel

Sampel ulkus dari pasien diabetes mellitus diambil menggunakan kapas lidi steril yang terlebih dahulu dibasahi dengan larutan NaCl fisiologis steril. Kapas tersebut kemudian diusapkan pada area luka, lalu dimasukkan ke dalam tabung media transport. Bagian batang lidi yang berada di luar tabung dipatahkan, dan tabung ditutup rapat untuk menjaga sterilisasi (Ernawati *et al.*, 2019).

2. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media *Brain Heart Infusion (BHI)*

- 1) Menimbang serbuk media BHI sebanyak 1,85 gram.
- 2) Ditambah aquades sebanyak 50 ml, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga larut.
- 3) Larutan media dituangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml, lalu ditutup dengan kapas. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan mendingin dan disimpan dalam lemari pendingin (Nasyiha *et al.*, 2022).

b. Pembuatan Media *Vogel Jhonson Agar (VJA)*

- 1) Menimbang serbuk media VJA sebanyak 6 gram.
- 2) Melarutkannya dengan 100 ml aquades, kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan sampai mendidih.
- 3) Larutan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml lalu ditutup menggunakan kapas.
- 4) Tabung yang berisi media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 5) Setelah sterilisasi, media dituangkan ke cawan petri secara aseptis. Pada masing-masing petri ditambahkan 3 tetes kalium tellurit, kemudian dihomogenkan, dibiarkan hingga mengeras, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C (Saputra *et al.*, 2023).

c. Pembuatan Media *Endo Agar*

- 1) Ditimbang media Endo agar sebanyak 5 gram
- 2) Ditambah aquades sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih
- 3) Larutan media yang telah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml dan ditutup menggunakan kapas.
- 4) Tabung berisi media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didiamkan hingga suhunya turun sekitar 50°C.

- 5) Media dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis, dibiarkan sampai mengeras, lalu disimpan di lemari pendingin (Vivin Pransiska *et al.*, 2023).
- d. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA) Miring**
- 1) Ditimbang Nutrien Agar (NA) sebanyak 2,3 gram.
 - 2) Ditambah aquades steril sebanyak 100 ml, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih.
 - 3) Larutan media dituangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml, lalu ditutup menggunakan kapas.
 - 4) Tabung berisi media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruang sekitar 30 menit hingga media mengeras dengan posisi miring $\pm 30^\circ$ (Ramadheni *et al.*, 2018).
- e. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)**
- 1) Menimbang serbuk Mueller Hinton Agar (MHA) sebanyak 5,7 gram.
 - 2) Melarutkannya dengan 100 ml aquades steril, kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan sampai mendidih.
 - 3) Larutan media dituangkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml dan ditutup rapat menggunakan kapas.
 - 4) Tabung yang berisi media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Setelah sterilisasi, media dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri berdiameter 15 cm, dibiarkan hingga memadat, lalu disimpan dalam lemari pendingin (Saputra *et al.*, 2023).
- 3. Pemeriksaan Secara Mikrobiologi**
- a. *Staphylococcus aureus***
- 1) Isolasi Bakteri
 - a) Sampel dari media transport *Brain Heart Infusion* (BHI) diambil sebanyak 1–2 ose, kemudian ditanam pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA).
 - b) Medium VJA selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam. Pertumbuhan bakteri dinyatakan positif apabila tampak koloni berwarna hitam dengan area sekeliling berwarna

- kuning.
- 2) Penanaman Pada Media *Nutrient Agar* (NA) Agar Miring
 - a) Koloni bakteri dari medium VJA diambil menggunakan ose steril.
 - b) Koloni tersebut kemudian ditanam pada medium NA miring dengan teknik gores zig-zag.
 - c) Media NA miring selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam (Ramadheni *et al.*, 2018).
 - 3) Identifikasi Bakteri dengan Pengecatan Gram
 - a) Objek glass yang akan digunakan difiksasi terlebih dahulu diatas api spirtus.
 - b) Koloni bakteri dari media VJA diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diratakan pada objekglass dengan gerakan memutar dari dalam keluar secara aseptis, kemudian difiksasi diatas api spirtus.
 - c) Preparat digenangi dengan pewarna Gram A (kristal violet) dibiarkan selama 60 detik dan bilas dengan air mengalir.
 - d) Preparat digenangi dengan pewarna Gram B (lugol iodine) dibiarkan selama 60 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir.
 - e) Preparat digenangi dengan pewarna Gram C (alkohol - aseton) dibiarkan selama 15 – 30 detik, kemudian dibuang.
 - f) Preparat digenangi dengan Gram D (safranin) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas perlahan dengan menggunakan air mengalir dan tiriskan tungku kering.
 - g) Preparat yang sudah kering diamati di bawah mikroskop dengan lensa objek 100x diberi minyak imersi. Gambaran mikroskopis bakteri berwarna ungu, berbentuk coccus. (Yanto *et al.*, 2021)
 - 4) Uji Biokimia
 - a) Uji Katalase
 - Beberapa tetes larutan H_2O_2 3% diteteskan pada kaca objek.

- Satu ose koloni bakteri dari media NA miring kemudian ditambahkan ke tetesan tersebut.
 - Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas (Yanto *et al.*, 2021)
- b) Uji Koagulase
- Satu tetes plasma sitrat diteteskan pada kaca objek, lalu ditambahkan satu ose bakteri dari media NA miring.
 - Hasil positif ditandai dengan munculnya penggumpalan (Yanto *et al.*, 2021)
- b. *Proteus mirabilis*
- 1) Isolasi Bakteri Pada Media Endo Agar
 - a) Sampel dari media transport BHI diambil sebanyak 1–2 ose, kemudian ditanam pada medium Endo Agar (EA).
 - b) Medium EA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri dinyatakan positif apabila tampak koloni dengan bentuk menyebar menyerupai awan atau bergelombang.
 - 2) Penanaman Pada Media *Nutrient Agar* (NA) Agar Miring
 - a) Koloni bakteri yang tumbuh pada medium EA diambil menggunakan ose steril.
 - b) Koloni tersebut kemudian diinokulasikan pada medium NA miring dengan teknik gores zig-zag.
 - c) Media NA miring diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Ramadheni *et al.*, 2018).
 - 3) Identifikasi Bakteri Pengecatan Gram
 - a) Objek glass yang akan digunakan difiksasi terlebih dahulu diatas api spirtus.
 - b) Koloni bakteri dari media EA diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diratakan pada objekglass dengan gerakan memutar dari dalam keluar secara aseptis, kemudian difiksasi diatas api spirtus.
 - c) Preparat digenangi dengan pewarna Gram A (kristal violet) dibiarkan selama 60 detik dan bilas dengan air mengalir.

- d) Preparat digenangi dengan pewarna Gram B (lugol iodine) dibiarkan selama 60 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir.
 - e) Preparat digenangi dengan pewarna Gram C (alkohol - aseton) dibiarkan selama 15 – 30 detik, kemudian dibuang.
 - f) Preparat digenangi dengan Gram D (safranin) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas perlahan dengan menggunakan air mengalir dan tiriskan tungku kering.
 - g) Preparat yang sudah kering diamati di bawah mikroskop dengan lensa objek 100x diberi minyak imersi. Gambaran mikroskopis bakteri berwarna merah, berbentuk basil. (Yanto *et al.*, 2021)
- 4) Identifikasi dengan Media Uji Biokimia
- a) Uji Biokimia pada media KIA

Koloni bakteri dari media NA miring diinokulasikan ke dalam media Kligler Iron Agar (KIA) menggunakan ose jarum secara aseptis, dengan cara ditusukkan ke dasar lalu digoreskan pada permukaan miring media. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji biokimia untuk *Proteus mirabilis* ditunjukkan dengan pola K/A, disertai pembentukan endapan hitam (S(+)) tanpa adanya produksi gas (G(-)); yaitu bagian lereng berwarna merah, dasar berwarna kuning, dan terdapat warna hitam pada dasar tabung.

- b) Uji Biokimia pada media LIA

Koloni bakteri dari media NA miring diinokulasikan ke dalam media Lysine Iron Agar (LIA) menggunakan ose jarum secara aseptis, dengan cara menusuk ke bagian dasar lalu menggores permukaan miring media. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji biokimia untuk *Proteus mirabilis* pada media ini adalah R/A, S(-), G(-), yang ditandai dengan lereng dan dasar berwarna merah

kecokelatan, tanpa pembentukan endapan hitam, serta tidak ada produksi gas.

c) Uji Biokimia pada media SIM

Koloni bakteri dari media NA miring ditanam pada media Sulfur Indole Motility (SIM) dengan menggunakan ose jarum secara aseptis melalui metode tusukan. Setelah itu, media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan menunjukkan pola (+ - +), yaitu terdapat endapan hitam pada jalur tusukan, permukaan media tidak berubah menjadi merah muda/ungu setelah penambahan reagen Erlich A dan B, serta terlihat kekeruhan yang menyebar di sekitar tusukan sebagai indikasi motilitas positif.

d) Uji Biokimia pada media Citrat

Koloni bakteri dari media NA miring diinokulasikan ke dalam media Simmons Citrate Agar menggunakan ose jarum secara aseptis dengan cara menggores permukaan miring media. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif pada uji Citrate untuk *Proteus mirabilis* ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru, yang mengindikasikan kemampuan bakteri memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

- a. Isolat bakteri dari media NA miring dipindahkan ke dalam media cair Brain Heart Infusion (BHI).
- b. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c. Tingkat kekeruhan media BHI dibandingkan dengan standar *McFarland* $0,5 \times 10^8$ cfu/ml, dengan cara mengamati kejelasan garis hitam pada kartu standar *McFarland* (Wiyatno, Agung., 2021)

5. Uji Sensitivitas

- a. Kapas lidi steril dimasukkan pada media BHI yang berisi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis*.

- b. Diinokulasikan pada media MHA dengan diusapkan pada media hingga merata secara aseptis.
- c. Diletakan disk antibiotik pada permukaan media MHA.
- d. Diinkubasi media MHA selama 24 – 48 jam pada suhu 37⁰ C.
- e. Diamati adanya zona hambat dan diukur menggunakan jangka sorong
- f. Disimpulkan apakah bakteri sensitif, resisten, atau intermediet terhadap antibiotik (Yanto *et al.*, 2021).

6. Interpretasi Hasil

Ukuran diameter zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan diameter zona hambat antibiotik pada tabel CLSI, apakah hasil tersebut menunjukkan hasil, sensitif, intermediet atau resisten, Adapun diameter zona hambat antibiotik menurut CLSI sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Diameter Zona hambat menurut CLSI 2024

NO	Jenis Antibiotik	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Sensitif	Intermediet	Resistan
1	Vankomisin	≥ 15	13 – 14	≤ 12
2	Tetrasiklin	≥ 15	12 – 14	≤ 11
3	Ciprofloxasin	≥ 26	22 – 25	≤ 21
4	Ampisilin	≥ 17	14 – 16	≤ 13

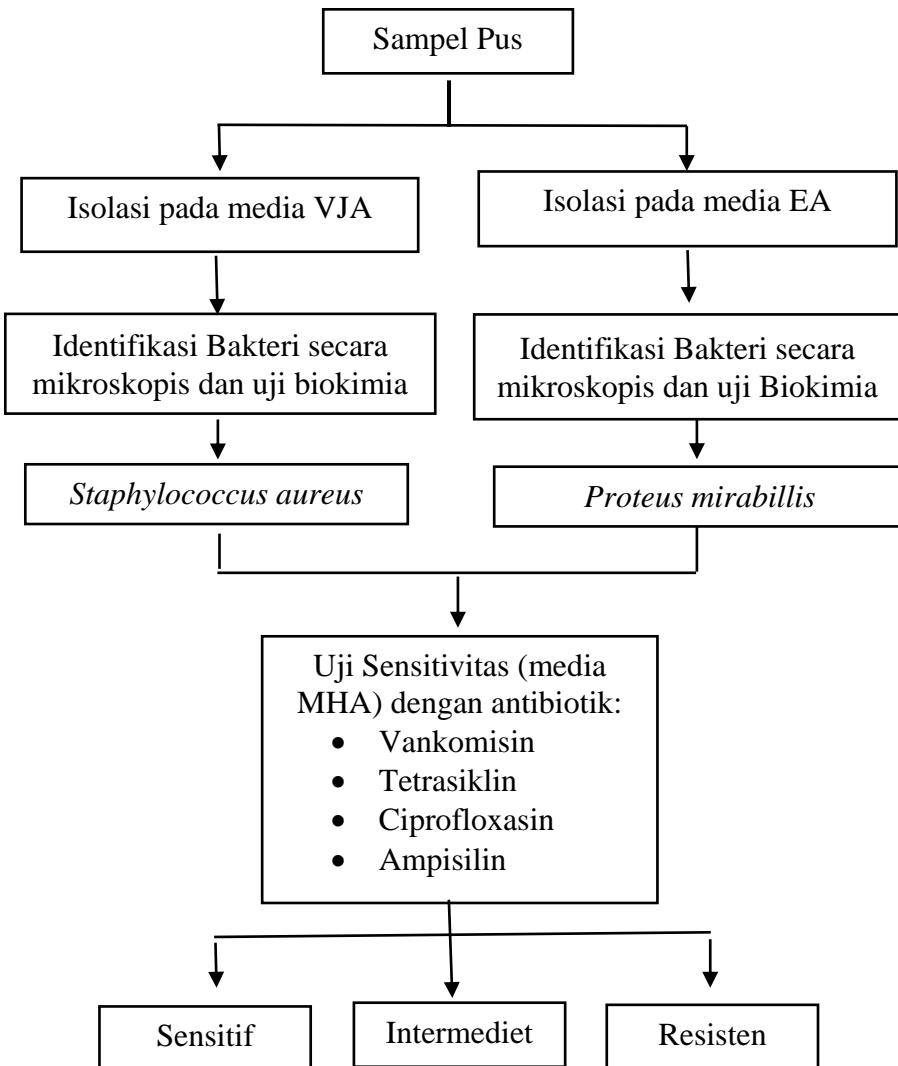
G. Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer. Data tersebut dilakukan dengan cara identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* pada ulkus pasien diabetes mellitus di Rumah SOLO - Perawatan luka diabetes dan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik.

H. Teknik Analisis Data

Data hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* yang diisolasi dari sampel pus pada ulkus pasien Diabetes Mellitus di Rumah perawatan luka diabetes dianalisis dengan metode difusi, hasil dibandingkan dengan standar diameter zona hambat yang ditetapkan oleh *Clinical Laboratory Standards Institute* (CSLI).

I. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian