

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk observasional laboratoris dengan pendekatan *cross-sectional*, untuk mendeskripsikan keberadaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* serta sensitivitasnya terhadap antibiotik berdasarkan hasil uji pada sampel ulkus dari pasien diabetes.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Pada bulan Februari - April 2025 dilakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi - Universitas Setia Budi dan rumah perawatan luka diabetes solo. Penelitian ini dilakukan di RUMAT Solo – Rumah Perawatan Luka Diabetes, cabang dari PT Rumah Perawatan Indonesia yang didirikan pada tahun 2010 oleh Dadang Suharto, S.Kp., WOCN dan Fakhrudin, S.T.. RUMAT Solo menyediakan layanan perawatan luka diabetes modern seperti *moist wound dressing*, *debridement*, dan edukasi pengendalian gula darah, dengan tujuan mempercepat penyembuhan serta mencegah infeksi dan amputasi. Klinik ini menjadi rujukan bagi pasien diabetes di wilayah Surakarta dan sekitarnya.

C. Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini yang menjadi subjek adalah ulkus pasien diabetes mellitus di RUMAT SOLO. Objek pada penelitian ini yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*.

1. Populasi

Pada penelitian ini, isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* yang diambil dari RUMAT Solo pada ulkus pasien Diabetes Mellitus.

2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sebanyak 10 sampel. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* diambil dari luka pasien RUMAT Solo yang menderita diabetes mellitus. Syarat sampel :

a. Inklusi

Pasien yang terdiagnosis diabetes mellitus, Pasien memberikan *informed consent* untuk bersedia pengambilan sampel, sampel diambil dari luka dengan derajat 1 dan 2 menurut Meggitt Wagner.

b. Eksklusi

Pasien dengan ulkus non-diabetik, pasien tidak bersedia mengikuti penelitian (tidak mengisi *informed consent*), sampel diambil dari luka dengan derajat 3, 4 dan 5 menurut Meggitt Wagner.

D. Variabel Penelitian

Variabel merupakan hal apa saja yang ditetapkan oleh seorang peneliti untuk informasi lebih lanjut. Dalam penelitian ini peneliti menggunakan variabel bebas dan terikat.

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* serta isolat ulkus pasien diabetes mellitus.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu uji sensitivitas bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*.

E. Definisi Operasional

1. Identifikasi Bakteri

Proses menentukan jenis bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* dari sampel ulkus pasien diabetes mellitus. Dilakukan menggunakan metode biokimia dan kultur bakteri pada media spesifik seperti MacConkey agar, TSI (*Triple Sugar Iron*), dan tes oksidase.

2. Uji Sensitivitas Antibiotik

Pengujian kemampuan antibiotik dalam menghambat atau membunuh bakteri yang diperoleh dari ulkus pasien. Pengujian dilakukan

dengan metode *Kirby-Bauer disk diffusion* sesuai standar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

3. Sampel Ulkus

Sumber spesimen berupa cairan luka dari ulkus pasien diabetes mellitus, yang diambil menggunakan teknik swab steril pada area ulkus yang terinfeksi.

F. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jas laboratorium, tabung spesimen, cawan petri steril, tabung reaksi, inkubator, rak tabung, enkas/LAF (*Leminar Air Flow*), objek gelas, pembakar spirtus, handscoon, masker, autoklaf, ose bulat dan lurus, kapas lidi steril, korek, penutup kapas, kertas label, spidol, pinset, coolbox.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel ulkus pasien diabetes mellitus, *disk Imipenem 10µg*, *disk Ampicilin 10µg*, *disk Ciprofloxacin 5µg*, *disk Gentamicin 10µg*, larutan standar *McFarland 0,5*, medium *Pseudomonas Selective Agar* (PSA), medium *MacConkey Agar* (MCA), medium *Brain Heart Infusion* (BHI), medium *Mueller Hinton Agar* (MHA), medium *Kligler's Iron Agar* (KIA), medium *Sulfida Indol Motility* (SIM), medium *Lysine Iron Agar* (LIA), medium *Simmons Citrate*, *aquadest* steril, reagen *erlich A*, *erlich B*, NaCl fisiologis 0,90%, oil imersi,

Cat Gram A (*Crystal Violet*), Cat Gram B (*Iodine/Lugol's Solution*), Cat Gram C (Alkohol 96%), Cat Gram D (*Safranin*), spirtus.

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

Media BHI ditimbang sebanyak 1,85 gram, kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquadest steril hingga homogen. Media yang telah homogen dibagi ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL, ditutup dengan kapas berlapis kertas atau foil. Media disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Proses sterilisasi selesai, media dikeluarkan, dibiarkan dingin pada suhu ruang, dan kemudian disimpan dalam lemari es.

b. Pembuatan Medium *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA ditimbang sebanyak 4,56 gram, dilarutkan dalam 120 mL aquadest steril. Larutan media dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih agar serbuk larut sempurna. Medium cair dituangkan ke dalam tabung reaksi, ditutup menggunakan kapas steril. Tabung yang berisi media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Medium cair dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril berukuran besar, dibiarkan hingga memadat pada suhu ruang, lalu disimpan dalam lemari es.

c. Pembuatan medium *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA)

Media PSA ditimbang sebanyak 45 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih agar seluruh serbuk larut sempurna. Medium cair

dituangkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas, disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Proses sterilisasi selesai, media dikeluarkan, dinginkan hingga memadat, tabung berisi media dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilan dan disimpan dalam lemari es.

d. Pembuatan medium *Mac Conkey Agar* (MCA)

Media MCA ditimbang sebanyak 51,53 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih agar bubuk larut sempurna. Medium cair dituangkan ke dalam tabung reaksi, ditutup menggunakan kapas, disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dikeluarkan dan didinginkan hingga memadat. Tabung yang berisi media padat kemudian dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilan dan disimpan dalam lemari es.

e. Pembuatan medium *Kligler's Iron Agar* (KIA)

Media KIA ditimbang sebanyak 57,52 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan larut sempurna. Media cair dituangkan ke dalam tabung reaksi secukupnya (± 5 mL per tabung), ditutup dengan kapas. Tabung berisi media kemudian disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dikeluarkan, dibiarkan mendingin, diletakkan secara miring sehingga terbentuk permukaan miring dan dasar tegak (slant and butt) hingga memadat tabung

dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilannya dan disimpan dalam lemari es.

f. Pembuatan medium *Sulfida Indol Motility* (SIM)

Media SIM ditimbang sebanyak 30 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan larut sempurna. Media cair dituangkan ke dalam tabung reaksi secukupnya (± 5 mL per tabung), lalu ditutup dengan kapas. Tabung berisi media kemudian disterilisasi dalam autoclave pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Media dikeluarkan, dibiarkan dingin hingga memadat. Tabung media padat kemudian dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilannya dan disimpan di dalam lemari es.

g. Pembuatan medium *Lysine Iron Agar* (LIA)

Media ditimbang sebanyak 45 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Media cair dituangkan ke dalam tabung reaksi (± 5 mL per tabung), ditutup dengan kapas. Tabung berisi media kemudian disterilisasi dalam autoclave pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Media dikeluarkan, dibiarkan mendingin, diletakkan miring sehingga terbentuk permukaan miring (slant) dan dasar tegak (butt). Tabung dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilannya dan disimpan di dalam lemari es.

h. Pembuatan medium *Simmons Citrate*

Media Citrat ditimbang sebanyak 45 gram, dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest. Larutan media dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Media cair dituangkan ke dalam tabung reaksi secukupnya (± 5 mL per tabung), ditutup dengan kapas steril. Tabung berisi media kemudian disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dikeluarkan, diletakkan miring sehingga terbentuk permukaan miring (*slant*) dan dasar tegak (*butt*). Tabung dibungkus dengan kertas untuk menjaga kesterilannya, disimpan di dalam lemari es.

G. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Luka atau ulkus dari pasien diabetes mellitus diambil menggunakan kapas lidi steril yang sudah dibasahi dengan NaCl fisiologis 0.90% dengan cara diusapkan kemudian dimasukan ke dalam tabung *culture swab* yang di dalamnya sudah terdapat media transport yaitu BHI.

2. Sterilisasi

a. Sterilisasi Medium

Medium yang telah dibuat dimasukkan ke dalam *autoclave*. Penutup pada *autoclave* dipastikan telah tertutup dengan rapat. Media dapat disterilkan dengan memanaskannya hingga 121°C dan

menyimpannya selama 15 menit. Tutup autoklaf dibuka setelah pembakar dimatikan dan suhu tekanan di dalamnya turun. Medium dibiarkan dingin, kemudian masukkan dalam lemari es.

b. Sterilisasi Alat

Gelas bekas direbus dalam disinfektan selama sekitar 10 hingga 15 menit. Tiriskan setelah menyabuni secara menyeluruh. Setelah itu alat-alat tersebut disterilisasi dalam oven selama kurang lebih selama 3 menit. Alat-alat yang telah di oven kemudian disimpan pada tempat yang kering.

3. Pemeriksaan Secara Mikrobiologi

a. Metode Kultur (Novelni, 2019)

- 1) Dipersiapkan alat, bahan, serta sampel pus yang sudah diambil dan dimasukkan dalam media transport Amies.
- 2) Disiapkan media BHI (*Brain Heart Infusion*) sebagai media pengkaya bakteri.
- 3) Sampel pus diambil dan ditanam pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) menggunakan kapas lidi steril.
- 4) Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.
- 5) Bakteri yang sudah diinkubasi pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) selanjutnya diamati kekeruhannya.
- 6) Dipersiapkan media MCA (*Mac Conkey Agar*)

- 7) Sampel dari media BHI selanjutnya ditanam dan diisolasi pada media MCA.
- 8) Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.
- 9) Setelah diinkubasi, diamati koloni yang muncul pada masing-masing media MCA dilakukan pendokumentasian hasil.
- 10) Koloni yang tumbuh pada media MCA, selanjutnya dilakukan uji biokimia. Media uji biokimia yang digunakan adalah media KIA (*Klinger Iron Agar*), SIM (*Sulfur Indole Motility*), LIA (*Lysine Iron Agar*) dan *Citrate*.
- 11) Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator
- 12) Diamati perubahan pada media KIA, LIA, SIM, dan *Citrate* Dilakukan pendokumentasian setiap hasil yang ada.

b. Mikroskopis (Pewarnaan Gram)

- 1) Koloni bakteri yang telah dibuat preparat ditetesi dengan Gram A (Kristal violet) dibiarkan 60 detik dan bilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan.
- 2) Ditetesi dengan Gram B (Lugol iodine) dibiarkan 60 detik dan bilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan.
- 3) Preparat dicuci dengan Gram C (Alkohol-Aseton) selama 15 sampai 30 detik.

- 4) Ditetesi dengan Gram D (Safranin) selama 60 detik dan bilas dengan air mengalir kemudian keringkan.
- 5) Dilihat dibawah mikroskop erbesaran 1000x. Hasil pengecatan Gram Pada bakteri *Pseudomonas aureginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* yaitu bersifat Gram Negatif yang berwarna merah dan berbentuk batang.

c. Uji Oksidase

- 1) Siapkan alat dan bahan, serta koloni bakteri
- 2) Teteskan 1 reagen *tetrametil p-phenylenediamine* diatas objek glass
- 3) Inokulasikan 1 ose koloni bakteri pada reagen *p-phenylenediamine* yang ada diobjek glass
- 4) Tunggu beberapa detik
- 5) Amati hasil, *Tetrametil p-phenylenediamine* teroksidasi oleh enzim oksidase menunjukkan warna biru keunguan (Uji positif).

d. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

- 1) Dipersiapkan alat dan bahan, serta biakan dari media BHI
- 2) Disiapkan media *Cetrimide* agar sebagai media selektif untuk *Pseudomonas aeruginosa*
- 3) Diambil koloni dari media BHI lalu dilakukan inokulasi pada media PSA dengan digoreskan pada permukaan media
- 4) Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 ×24 jam dalam inkubator

- 5) Dilakukan pengamatan pada media *Cetrimide* yang telah diinkubasi, dilihat koloni yang terbentuk
- 6) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* akan membentuk pigmen berwarna kehijauan.
- 7) Dilakukan pencatatan dan dokumentasi pada hasil yang diperoleh.

e. Identifikasi *Klebsiella pneumonia*

- 1) Dipersiapkan alat dan bahan, serta biakan dari media BHI
- 2) Diambil koloni dari media BHI lalu dilakukan inokulasi pada media MCA dengan digoreskan pada permukaan media
- 3) MCA merupakan media selektif *Klebsiella pneumonia*
- 4) Setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
- 5) Koloni yang dihasilkan akan tampak berwarna pink karena fermentasi laktosa, serta koloninya besar, berlendir (*muroid*).
- 6) Dilakukan pencatatan dan dokumentasi pada hasil yang diperoleh.

f. Uji Sensitivitas Antibiotik

Pengujian dilakukan secara difusi dengan cakram Kirby Bauer.

- 1) Kapas lidi steril dimasukkan pada media BHI berdasarkan suspensi standar McFarland 0,5x10⁶ cfu/ml yang mengandung biakan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*.
- 2) Diinokulasikan pada media MHA dengan cara dioleskan.

- 3) Diletakkan cakram yang berisi antibiotik pada permukaan MHA.
- 4) Diinkubasi media MHA dengan suhu 37° C selama 24-48 jam.
- 5) Diamati hasil dengan cara mengukur diameter zona hambat disekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong.

H. Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer. Pasien ulkus diabetikum di Rumah Perawatan Luka Diabetes, Solo yang di lakukan skrining adanya *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* untuk menyediakan data primer penelitian.

I. Teknik Analisis Data

Metode analisis difusi diterapkan untuk membandingkan diameter zona hambat dari sampel ulkus pasien Diabetes Mellitus yang dirawat di RUMAT SOLO selama Februari hingga April 2025 dengan standar diameter zona hambat yang ditetapkan oleh CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*). Hal ini dilakukan sebagai bagian dari identifikasi dan pengujian sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* terhadap antibiotik.

**Tabel 3.1 Diameter Zona Hambat menurut CLSI
hal 58-79 (Lewis et al., 2023)**

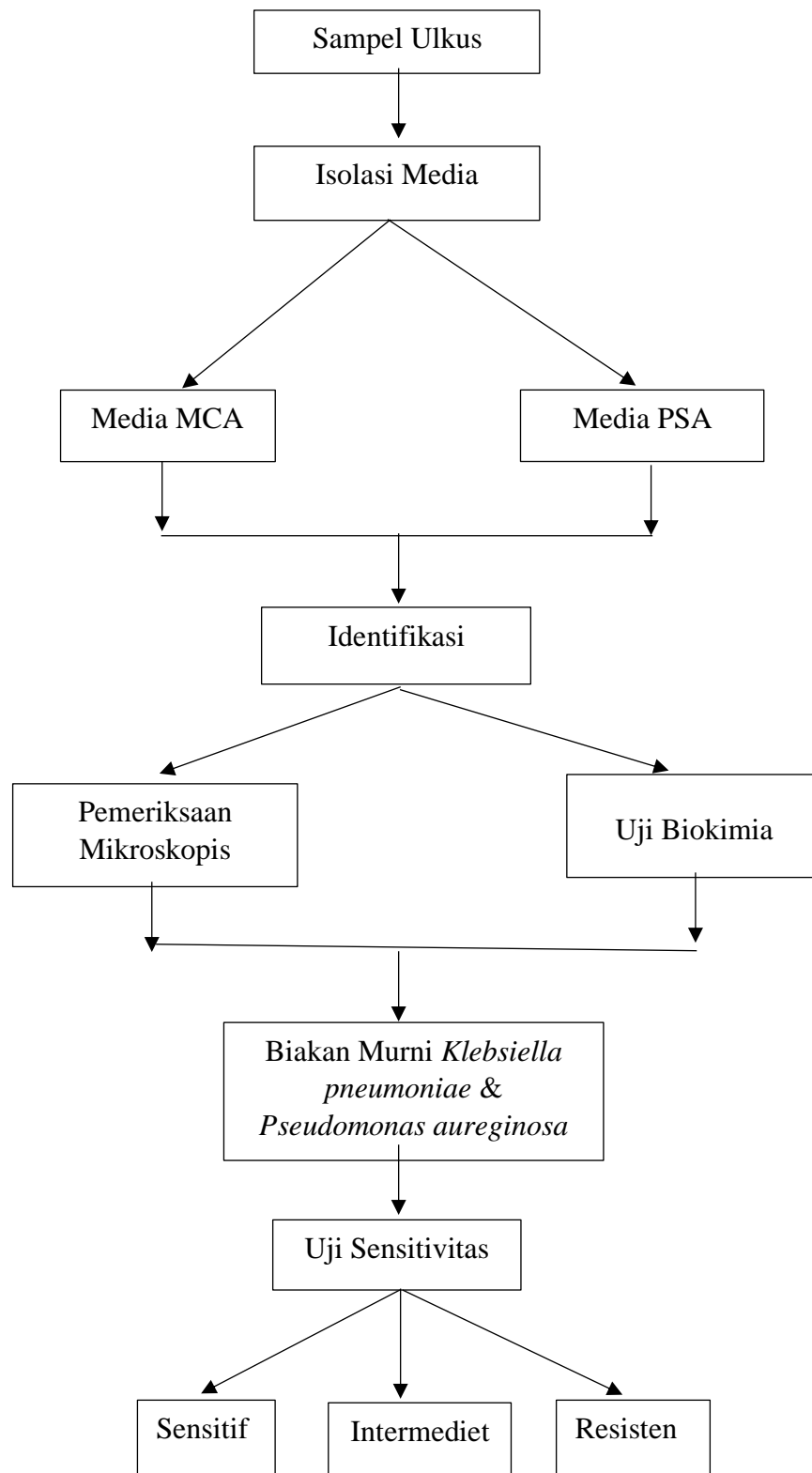
Bakteri & Antibiotik	CLSI M100-Ed33(mm)		
	S	I	R
<i>Gentamicin</i>	≥ 15	13-14	≤ 12
<i>Ampicilin</i>	≥ 17	14-16	≤ 13
<i>Ciprofloxacin</i>	≥ 25	19-24	≤ 18
<i>Imipenem</i>	≥ 19	16-18	≤ 15

Keterangan :

S : Sensitif

I : Intermediate

R : Resisten

J. Alur Penelitian**Gambar 3.1 Alur Penelitian**