

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan pendekatan deskriptif kualitatif. Data yang dikumpulkan disajikan secara deskriptif, mencakup karakteristik makroskopis, mikroskopis, serta hasil uji biokimia terhadap bakteri. Studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada pasien *Diabetes Mellitus* (DM) di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi Surakarta, serta mengevaluasi sensitivitas bakteri tersebut terhadap antibiotik yang digunakan di rumah sakit tersebut.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Identifikasi dan uji sensitivitas terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada kasus ulkus diabetikum dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta pada bulan Januari 2025.

3.3. Populasi Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh pasien *diabetes mellitus* (DM) yang menjalani perawatan di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi Surakarta pada periode Desember 2024 – Januari 2025. Sebanyak 6 pasien *diabetes mellitus* (DM) dan dipilih secara random dari populasi.

3.4. Alat dan Bahan

a. Alat

1. Tabung Reaksi
2. Rak Tabung Reaksi
3. Autoklaf
4. Inkubator
5. Cawan Petri
6. Ose
7. Kapas Lidi Steril
8. Laminar Air Flow
9. Lampu Spirtus
10. Mikroskop
11. Objek Glass
12. Disk Antibiotik

b. Bahan

1. Endo Agar (EA)
2. *MacConkey Agar* (MCA)
3. *Manitol Salt Agar* (MSA)
4. *Brain Heart Infusion* (BHI)
5. *Kliger's Iron Agar* (KIA)
6. *Lysin Iron Agar* (LIA)
7. *Sulfate Indol Moltility* (SIM)
8. *Muller Hinton Agar* (MHA)

9. Erlich A
10. Erlich B
11. Citrat
12. Plasma citrat
13. Larutan H₂O₂
14. Gram A (Kristal Violet)
15. Gram B (Lugol Iodin)
16. Gram C (Etanol & Aseton)
17. Gram D (Safranin)
18. Minyak Imersi

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Persiapan Sampel Pemeriksaan

Sebanyak 5 sampel swab ulkus diabetikum di ambil pada Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi Surakarta yang telah ditanam pada media Transport. Sampel dibawa menuju Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi (USB) untuk dilakukan isolasi pada media BHI.

3.5.2. Isolasi dan Identifikasi *Esherichia coli*

a. Isolasi *Esherichia coli*

1. Disiapkan 5 sampel swab ulkus diabetikum yang telah diambil dari Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi yang di tanam pada media Transport *Amies* atau *Stuart*.

2. Mengambil 1 ose biakan pada media Transport *Amies* atau *Stuart*, kemudian dimasukkan ke dalam media BHI.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

b. Identifikasi *Escherichia coli* dengan media *MacConkey Agar* dan *Endo Agar*

1. Diambil 1 ose biakan dari media BHI dan digoreskan pada media *Endo Agar* dan *MacConkey Agar*.
2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Diamati ada tidaknya koloni *Escherichia coli* pada media. Pada media *Endo Agar* akan membentuk koloni berwarna kilat logam dan pada media *MacConkey Agar* akan membentuk koloni berwarna merah kabut.

c. Uji Biokimia

1. Pada Uji Biokimia, dilakukan inokulasi dari media *Endo Agar* dan *MacConkey Agar* ke dalam media KIA, SIM, LIA, dan Citrat.
2. Diambil biakan yang di duga *Escherichia coli* pada media *Endo Agar* kemudian lakukan penusukan lalu digores pada bagian lereng pada agar KIA & LIA, penggoresan pada bagian lereng media SIM, dan penusukan pada media SIM.
3. Melakukan hal yang sama dengan biakan yang diambil dari media MCA.
4. Media KIA, LIA, SIM dan Citrat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.3. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus*

a. Isolasi *Staphylococcus aureus*

1. Disiapkan 5 sampel swab ulkus diabetikum yang telah diambil dari Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi yang di tanam pada media *Transport Amies* atau *Stuart*.
2. Diambil 1 ose biakan pada media *Transport Amies* atau *Stuart*, kemudian dimasukkan ke dalam media BHI.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

b. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan Media *Manitol Salt*

Agar

1. Diamati adanya kekeruhan pada media BHI. Jika terdapat kekeruhan, maka diambil 1 ose kemudian diinokulasikan dengan cara goresan pada media *Manitol Salt Agar* (MSA).
2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Diamati ada tidaknya koloni *Staphylococcus aureus* pada media MSA. Koloni *Staphylococcus aureus* pada media akan berbentuk bulat dan warna koloni kuning dengan media berwarna kuning.

c. Pengecatan Gram

1. Diambil satu ose biakan pada media MSA kemudian ratakan di objeck glass yang bersih dan bebas lemak secara aseptis, kemudian fiksasi sebentar.
2. Digenangi preparat dengan Gram A (kristal violet) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.

3. Digenangi preparat dengan Gram B (lugol iodine) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
4. Digenangi preparat dengan Gram C (etanol) tunggu selama 30 detik, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
5. Digenangi preparat dengan Gram D (safranin) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
6. Ditiriskan, kemudian diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak imersi.

d. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan Uji Katalase

1. Diamati adanya pertumbuhan koloni pada media MSA, koloni yang akan diuji katalase.
2. Ditetaskan di object glass larutan H_2O_2 3% kemudian ambil 1 ose koloni diratakan diatas object glass yang sudah ditetesi H_2O_2 3%, amati adanya gelembung.

e. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan Uji Koagulase

1. Diamati adanya pertumbuhan koloni pada media MSA, kemudian diinokulasikan pada media BHI.
2. Diinkubasikan pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam.
3. Diamati adanya kekeruhan pada media BHI.
4. Diambil 1 ml larutan plasma citrat kemudian ditambahkan 1 ml suspensi bakteri dari media BHI. Inkubasi $37^\circ C$ selama 24 jam. Diamati adanya gumpalan dan kekeruhan

3.5.4. Uji Sensitivitas *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

a. Uji Sensitivitas *Escherichia coli*

1. Disiapkan biakan *Escherichia coli* yang telah diisolasi pada media *Endo Agar* atau *MacConkey Agar*.
2. Diambil sebanyak 1 ose biakan dari koloni, kemudian dimasukkan ke dalam media BHI.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
4. Dibuat suspensi ke dalam 2,5 ml NaCl fisiologis sampai kekeruhan mencapai *McFarland* 0,5.
5. Dichelupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi lalu diperas pada dengan cara menekan dan memutar pada dinding tabung.
6. Diinokulasikan suspensi bakteri secara perataan menggunakan kapas lidi steril ke dalam lempeng agar dari media MHA. Diamkan selama 10 menit hingga biakan terdifusi ke dalam media.
7. Diletakkan disk antibiotik *amoxicillin* dan *siproflosasin* menggunakan pinset steril, atur jarak masing-masing disk.
8. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
9. Diamati hasilnya dan diukur diameter daerah hambatan.

b. Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus*

1. Disiapkan biakan *Staphylococcus aureus* yang telah diisolasi pada media *Manitol Salt Agar*.
2. Diambil sebanyak 1 ose biakan, kemudian dimasukkan ke dalam media BHI.

3. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
4. Dibuat suspensi ke dalam 2,5 ml NaCl fisiologis sampai kekeruhan mencapai McFarland 0,5.
5. Dichelupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi lalu diperas pada dengan cara menekan dan memutar pada dinding tabung.
6. Diinokulasikan suspensi bakteri secara perataan menggunakan kapas lidi steril ke dalam lempeng agar dari media MHA. Diamkan selama 10 menit hingga biakan terdifusi ke dalam media.
7. Diletakkan disk antibiotik *Amoxicillin* dan *Ciproflosasin* menggunakan pinset steril, atur jarak masing-masing disk.
8. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
9. Diamati hasilnya dan diukur diameter daerah hambatan.

3.6. Teknik Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dilakukan dengan pendekatan deskriptif kualitatif, yang mencakup pengamatan terhadap karakteristik makroskopis dan mikroskopis, hasil uji biokimia *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, serta hasil uji sensitivitas kedua bakteri terhadap antibiotik.

3.7. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif kualitatif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, dan hasil uji biokimia *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta hasil uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan hasil uji yang telah dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Moewardi Surakarta.