

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan penelitian analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan untuk mengetahui sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Penelitian ini dilakukan dengan cara menemukan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* dalam sampel urin pasien infeksi saluran kemih yang kemudian diuji sensitivitasnya.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2025. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* yang didapatkan dari sampel urin pasien infeksi saluran kemih di Rumah Sakit X.

2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sebanyak 10 sampel urin. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* yang berasal dari urin pasien infeksi saluran kemih.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

- a. Variabel utama dari penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* yang berasal dari sampel urin pasien infeksi saluran kemih pada bulan Maret 2025.
- b. Variabel utama kedua adalah diameter zona hambat antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi dari sampel urin pasien infeksi saluran kemih didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit X.

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, Ciprofloksasin, Imipenem, Ampisilin, dan Gentamisin. Variabel terikat (dependen) dalam penelitian ini adalah hasil sensitivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* terhadap antibiotik.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

- a. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Staphylococcus aureus* dari sampel urin pasien infeksi saluran kemih ditumbuhkan pada media padat dan media cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu media *Vogel Johnson Agar* (VJA) sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- b. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari sampel urin pasien infeksi saluran kemih ditumbuhkan pada media padat dan cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu media *Mac Conkey Agar* (MCA) sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- c. Uji sensitivitas adalah uji kepekaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* terhadap beberapa antibiotik menggunakan metode difusi cakram (*Kirby - Bauer*) yang dapat dilihat dari diameter zona hambat kemudian dibandingkan dengan standar diameter zona hambat yang sudah ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) dan diukur dalam skala rasio dengan satuan milimeter.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Tabung reaksi steril, cawan petri, beaker glass, kapas lidi steril, objek glass, ose bulat, ose jarum, pembakar spirtus, inkubator, inkas atau *Bio Safety Cabinet*, autoklaf, oven, mikroskop, pinset, korek, rak tabung reaksi, rak pewarnaan,

pipet tetes, neraca analitik, kapas, kertas label, handscoon, masker, jas laboratorium.

2. Bahan

- a. Sampel urin pasien infeksi saluran kemih
- b. Media *Vogel Johnson Agar* (VJA)
- c. Media *Mac Conkey Agar* (MCA)
- d. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- e. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- f. Media KIA, SIM, LIA, Citrat
- g. Pewarna Gram A berisi cat *Kristal violet*
- h. Pewarna Gram B berisi larutan lugol *Iodine*
- i. Pewarna Gram C berisi larutan alkohol – aseton
- j. Pewarna Gram D berisi cat safranin
- k. Disk antibiotik Vankomisin, Tetrasiklin, Ciprofloxacin, Imipenem, Ampisilin, dan Gentamisin.

F. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

a. Midstream

- 1) Dilakukan desinfeksi pada area jalan pengeluaran urin dengan kasa steril.
- 2) Dikeluarkan urin, urin yang pertama mengalir dibuang, urin selanjutnya keluar dimasukkan ke dalam pot atau wadah urin.
- 3) Wadah atau pot urin ditutup dengan rapat.
- 4) Identitas pasien ditulis pada wadah atau pot urin (Mochtar, 2015).

b. Kateter Urine

- 1) Dilakukan desinfeksi pada selang kateter dengan alkohol 70%.
- 2) Dilakukan aspirasi atau pengambilan urin menggunakan sput.
- 3) Dimasukkan urin ke dalam wadah atau pot urin (Firdausi, 2020).

2. Pembuatan Media

a. Pembuatan Medium *Vogel Johnson Agar* (VJA)

- 1) Ditimbang bubuk *Vogel Johnson Agar* (VJA) sebanyak 6 Gram.
- 2) Ditambahkan aquades 100 ml dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih.
- 3) Medium dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- 4) Medium dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit, dan ditambahkan 3 ml kalium telurite, dihomogenkan hingga endapan tersuspensi.
- 5) Medium dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis, dibiarkan memadat dan disimpan dalam lemari pendingin (Saputra *et al.*, 2023).

b. Pembuatan Medium *Mac Conkey Agar* (MCA)

- 1) Ditimbang media *Mac Conkey Agar* (MCA) sebanyak 15 Gram.
- 2) Ditambahkan aquades sebanyak 250 ml kemudian dihomogenkan dan dipanaskan tidak sampai mendidih.
- 3) Medium yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan menggunakan kapas.
- 4) Medium dimasukkan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.
- 5) Medium dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis, dibiarkan memadat, kemudian dimasukkan inkubator pada suhu 37°C (Kholifah, 2022).

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

- 1) Ditimbang bubuk *Brain Heart Infusion* (BHI) sebanyak 3,7 Gram.
- 2) Ditambahkan aquades steril sebanyak 100 ml dan dihomogenkan.
- 3) Medium dituang kedalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- 4) Medium dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit, dibiarkan memadat dan disimpan dalam lemari pendingin (Saputra *et al.*, 2023).

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

- 1) Ditimbang bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 11,4 Gram.
- 2) Ditambah aquades steril sebanyak 300 ml, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih.
- 3) Medium dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- 4) Medium dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.
- 5) Medium dituangkan ke cawan petri berdiameter 15 cm secara aseptis, dibiarkan memadat dan disimpan dalam lemari pendingin (Fitriyanti *et al.*, 2020).

3. Pemeriksaan Secara Mikrobiologis

a. *Staphylococcus aureus*

- 1) Isolasi Bakteri
 - a) Sampel urin diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diinokulasikan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA).
 - b) Medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
 - c) Hasil positif terdapat bakteri ditandai dengan adanya koloni berwarna hitam dengan zona kuning di sekitarnya.
- 2) Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Pengecatan Gram
 - a) Disterilkan terlebih dahulu objek glass yang akan digunakan dengan cara dilewatkan diatas api spiritus.
 - b) Koloni bakteri dari media VJA diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diratakan pada objek glass dengan gerakan memutar dari dalam keluar secara aseptis, kemudian difiksasi diatas api spiritus.
 - c) Preparat digenangi dengan pewarna Gram A (kristal violet) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas dengan air mengalir dan tiriskan.
 - d) Preparat digenangi dengan pewarna Gram B (lugol iodine) dibiarkan selama 60 detik,

kemudian bilas dengan air mengalir dan tiriskan.

- e) Preparat digenangi dengan pewarna Gram C (alkohol - aseton) dibiarkan selama 15 – 30 detik, kemudian dibuang.
 - f) Preparat digenangi dengan pewarna gram D (safranin) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas perlahan dengan menggunakan air mengalir dan tiriskan.
 - g) Preparat yang sudah kering diamati dengan mikroskop lensa obyektif perbesaran 100x beri minyak imersi. Gambaran mikroskopis bakteri berwarna ungu, berbentuk coccus (Yashir & Apriani, 2019).
- 3) Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Uji Biokimia

a) Uji Katalase

Larutan H_2O_2 3% diteteskan pada objek glass, kemudian 1 ose koloni bakteri dari media VJA. Amati adanya gelembung gas yang menunjukkan hasil positif.

b) Uji Koagulase

Diteteskan 1 tetes larutan plasma citrat, kemudian diambil 1 ose bakteri. Amati ada atau tidaknya gumpalan yang menunjukkan hasil positif (Prabowo & Habib, 2016).

b. *Klebsiella pneumoniae*

1) Isolasi Bakteri

- a) Sampel urin diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diinokulasikan pada medium *Mac Conkey Agar* (MCA).

- b) Medium *Mac Conkey Agar* (MCA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

- c) Hasil positif terdapat bakteri ditandai dengan adanya koloni berwarna merah muda atau pink.

2) Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan Pengecatan Gram

- a) Disterilkan terlebih dahulu objek glass yang akan

digunakan diatas api spiritus.

- b) Koloni bakteri dari media MCA diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diratakan pada objek glass dengan gerakan memutar dari dalam keluar secara aseptis, kemudian difiksasi diatas api spiritus.
 - c) Preparat digenangi dengan pewarna Gram A (kristal violet) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas dengan air mengalir dan tiriskan.
 - d) Preparat digenangi dengan pewarna Gram B (lugol iodine) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas dengan air mengalir dan tiriskan.
 - e) Preparat digenangi dengan pewarna Gram C (alkohol - aseton) dibiarkan selama 15 – 30 detik, kemudian dibuang.
 - f) Preparat digenangi dengan pewarna gram D (safranin) dibiarkan selama 60 detik, kemudian bilas perlahan dengan menggunakan air mengalir dan tiriskan.
 - g) Preparat yang sudah kering diamati dengan mikroskop lensa obyektif perbesaran 100x beri minyak imersi. Gambaran mikroskopis bakteri berbentuk batang dan tidak berspora.
- 3) Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan Uji Biokimia
- a) Uji Biokimia pada media KIA

Koloni bakteri dari media MCA diinokulasikan pada media KIA menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menusuk lalu digoreskan sampai lereng media, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji biokimia pada media KIA untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah (A/A/S (-)/G (+)) yang dimana pada bagian lereng dan dasar berwarna kuning, tidak membentuk warna hitam, serta menghasilkan gas.

- b) Uji Biokimia pada media SIM

Koloni bakteri dari media MCA diinokulasikan pada media SIM menggunakan

ose jarum secara aseptis dengan menusuk media, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati hasil uji biokimia pada media SIM untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah (- - -) pada bagian tusukan tidak ada warna hitam, permukaan media tidak berwarna merah muda atau ungu setelah pemberian erlich A dan B, serta tidak ada kekeruhan yang menyebar disekitar tusukkan.

c) Uji Biokimia pada media LIA

Koloni bakteri dari media MCA diinokulasikan pada media LIA menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menusuk lalu digoreskan sampai lereng media, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji biokimia pada media LIA untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah (K/K/S (-)/G (-)) yang dimana pada bagian lereng dan dasar berwarna ungu, tidak terbentuk warna hitam, serta tidak menghasilkan gas.

d) Uji Biokimia pada media Citrat

Koloni bakteri dari media MCA diinokulasikan pada media Citrat menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menggores media sampai lereng, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati hasil uji biokimia pada media Citrat untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah positif (+) ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru (Yashir & Apriani, 2019).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

- 1) Isolat bakteri dari media NA miring diinokulasikan pada media cair BHI.
- 2) Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 3) Diamati kekeruhan yang terjadi pada media BHI lalu dibandingkan dengan standar *Mc Farland* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dengan cara membandingkan ketajaman garis hitam pada kertas *Mc Farland* (Yashir & Apriani, 2019).

d. Uji Sensitivitas Antibiotik

- 1) Kapas lidi steril dimasukkan pada media BHI yang berisi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae*.
- 2) Diinokulasikan pada media MHA dengan cara dioleskan hingga merata secara aseptis.
- 3) Diletakkan disk antibiotik pada permukaan media MHA.
- 4) Diinkubasi media MHA pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam.
- 5) Diamati hasil dengan cara mengukur diameter zona hambat disekitar cakram menggunakan jangka sorong.
- 6) Disimpulkan apakah bakteri sensitif, resisten, atau intermediet terhadap antibiotik (Prabowo & Habib, 2016).

e. Interpretasi Hasil

Ukuran diameter zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan diameter zona hambat antibiotik pada tabel CLSI, apakah hasil menunjukkan sensitif, intermediet, atau resisten.

G. Teknik Pengumpulan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data tersebut dilakukan dengan cara identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* pada pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK) dan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik.

H. Teknik Analisis Data

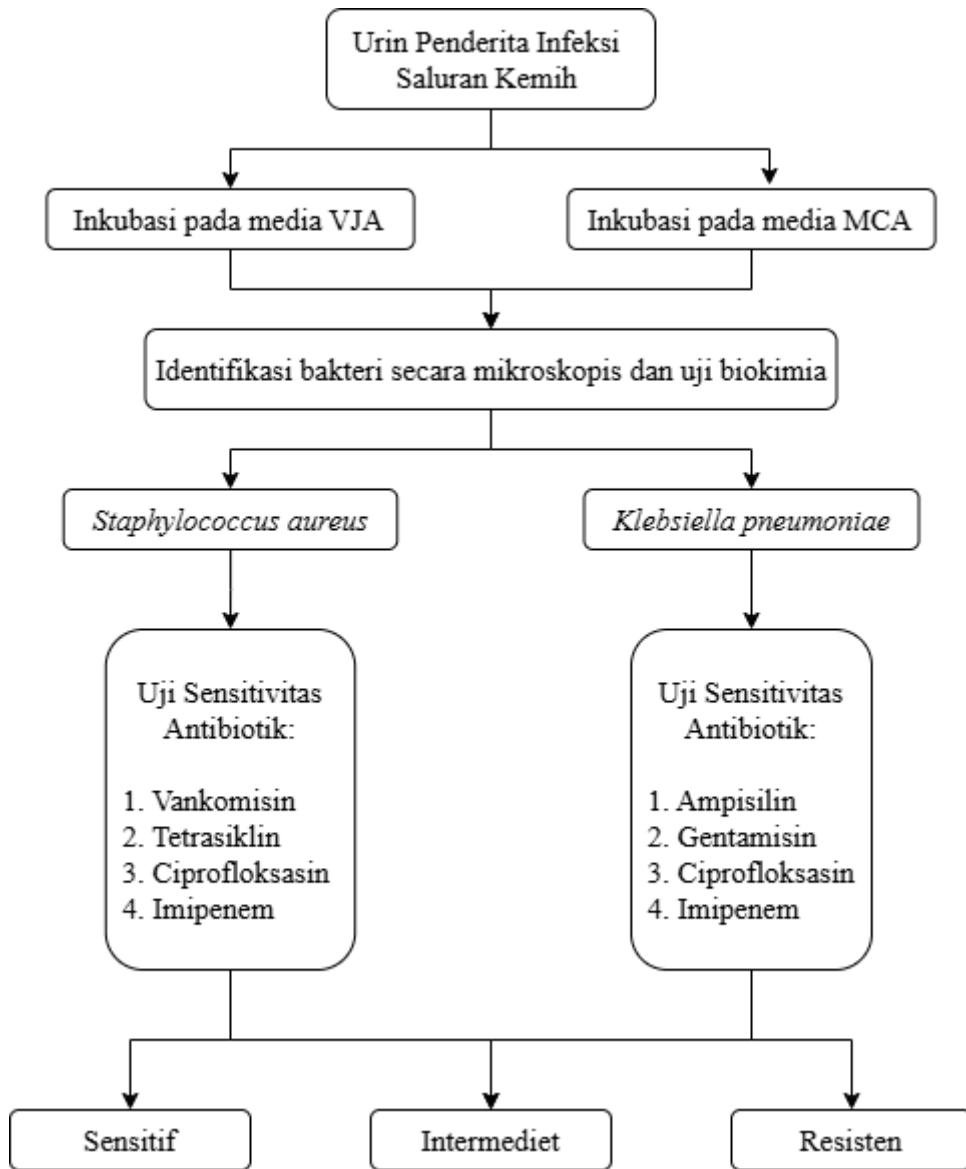
Data hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi dari sampel urin pada pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK) dianalisis dengan metode difusi, hasil dibandingkan dengan standar diameter zona hambat yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), kemudian ditentukan sensitif, intermediet, atau resisten terhadap antibiotik.

I. Penyajian Data

Hasil uji ditampilkan dalam bentuk tabel yang memuat:

1. Hasil identifikasi bakteri dari sampel urin
2. Hasil ukuran diameter zona hambat yang dibandingkan dengan CLSI.

J. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alur Penelitian