

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan untuk mengetahui sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Penelitian ini dilakukan dengan cara menemukan bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam sampel urine pasien infeksi saluran kemih yang kemudian diuji sensitivitasnya.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari -Maret 2025. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan dari hasil isolasi sampel urine pasien infeksi saluran kemih di Rumah sakit UNS.

2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 10 sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari urine pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK) di Rumah Sakit UNS.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

- a. Variabel utama dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari sampel urine pasien ISK di Rumah Sakit UNS pada bulan Maret 2025.
- b. Variabel utama kedua adalah diameter zona hambat antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari sampel urin

pasien ISK yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit UNS.

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 Amikacin, Ampicilin, Ciprofloxacin, dan Imipenem. Variabel terikat (dependen) dalam penelitian ini adalah hasil sensitivitas bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

- a. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari sampel urine pasien ISK ditumbuhkan pada media padat dan media cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- b. Media pemisahan dan penyuburan bakteri *Escherichia coli* dari sampel urine pasien ISK ditumbuhkan pada media padat dan cair. Media pemisahan menggunakan media padat yaitu *Endo Agar* sedangkan media cair untuk penyuburan menggunakan media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- c. Uji sensitivitas adalah uji kepekaan bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* 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 and Laboratory Standards 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 *Laminar Air Flow*, 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 Urine Pasien Infeksi Saluran Kemih di RS UNS
- b. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- c. Media *Endo Agar*
- d. Media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA)
- e. Natrium sulfat
- f. Media SIM, KIA, LIA, Citrat
- g. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- h. Pewarna Gram A berisi *Kristal violet*
- i. Pewarna Gram B berisi larutan *Lugol Iodine*
- j. Pewarna Gram C berisi larutan Alkohol – aseton
- k. Pewarna Gram D berisi Safranin
- l. Hidrogen peroksida 3%
- m. NaCl fisiologis
- n. Disk antibiotik (Gentamicin, Ampicilin, Ciprofloxacin dan Imipenem)

F. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel

a. *Mid Stream*

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

b. Kateter Urine

- 1) Dilakukan desinfeksi pada selang kateter dengan alkohol 70%.
- 2) Dilakukan aspirasi atau pengambilan urine dengan menggunakan spuit.
- 3) Dimasukkan urine ke dalam wadah atau pot urine.
- 4) Identitas pasien ditulis pada wadah atau pot urine.

2. Pembuatan Media

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

- 1) Ditimbang bubuk Brain Heart Infusion (BHI) Sebanyak 1,85 gram
- 2) Ditambah aquades steril sebanyak 50 ml dan dihomogenkan
- 3) Medium dituang kedalam tabung reaksi 5 ml dan ditutup dengan kapas
- 4) Medium dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit, dibiarkan dingin dan disimpan dalam lemari es (Qamariah *et al.*, 2018).

b. Pembuatan Media *Pseudomonas Selective Agar (PSA)*

- 1) Ditimbang bubuk *Pseudomonas Selective Agar (PSA)* Sebanyak 4,63 gram.
- 2) Dimasukkan bubuk media ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 ml kemudian dipanaskan dengan menggunakan hotplate agar homogen.
- 3) Medium yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup menggunakan kapas.
- 4) Disterilisasi medium dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit.
- 5) Menuangkan medium ke dalam cawan petri steril, tunggu hingga membeku atau memadat.
- 6) Simpan didalam almari pendingin.

c. Pembuatan Media *Endo Agar*

- 1) Ditimbang media *Endo Agar* sebanyak 3,7 gram
- 2) Ditambah aquades sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih
- 3) Ditambah dengan Natrium sulfat sebanyak 3 tetes
- 4) Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10 ml dan ditutup dengan menggunakan kapas.
- 5) Medium dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit, kemudian diangkat tunggu suhu turun sampai 50° C.
- 6) Medium dituangkan ke dalam cawan petri secara

aseptis, dibiarkan sebentar sampai media padat, kemudian disimpan dalam lemari es.

d. Pembuatan Media Agar Miring

- 1) Ditimbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 0,28 gram.
- 2) Dilarutkan dengan 10 ml aquadest dalam erlenmeyer, kemudian dihomogenkan.
- 3) Diambil sebanyak 5 ml larutan NA, kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi dan diletakkan dengan posisi miring dan dibiarkan hingga memadat (Kurama *et al.*, 2020).

e. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

- 1) Ditimbang bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 19 gram.
- 2) Ditambah aquades steril sebanyak 500 ml, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih
- 3) Medium dituangkan ke dalam tabung reaksi 10 ml dan ditutup dengan kapas.
- 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 es (Qamariah *et al.*, 2018).

3. Pemeriksaan Secara Mikrobiologi

a. *Escherichia coli*

- 1) Isolasi Bakteri
 - a) Sampel diambil sebanyak 1 – 2 ose kemudian diinokulasikan pada medium *Endo Agar*.
 - b) Medium *Endo Agar* diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan adanya koloni berwarna merah gelap dengan kilau metalik.
- 2) Penanaman Bakteri Pada Media Agar Miring
 - a) Diambil 1 koloni dari media *Endo Agar* kemudian diinokulasikan pada media agar miring.
 - b) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 3) Identifikasi Bakteri Pengecatan Gram
 - a) Objek glass yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu diatan api spiritus.

- b) Koloni bakteri dari media *Endo Agar* diambil sebanyak 1 – 2 ose diratakan pada objekglass dengan gerakan memutar dari dalam keluar secara aseptis, 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.

b. *Pseudomonas aeruginosa*

- 1) Isolasi Bakteri
 - a) Diambil sampel urine 1-2 ohse,
 - b) Diisolasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA).
 - c) Diinkubasi dalam 1 x 24 jam pada suhu 37⁰ C.
 - d) Diamati hasil isolasi, apabila hasil menunjukkan hasil positif adanya *Pseudomonas aeruginosa* maka terdapat koloni bulat, cembung kering dengan tepi rata dan pigmen piosianin atau pigmen pioverdin berwarna fluoresens (kehijauan/biru kehijauan).
- 2) Penanaman Bakteri Pada Media Agar Miring
 - a) Diambil 1 koloni dari media *Endo Agar* kemudian diinokulasikan pada media agar miring.
 - b) Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
- 3) Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan

Pengecatan Gram

- a) Diambil 1-2 ose biakan pada media PSA kemudian ratakan pada objek glass yang bersih serta bebas lemak secara aseptis, kemudian di sterilisasi sebentar.
- b) Preparat digenangi dengan menggunakan cat Gram A (kristal violet) ± 60 detik, kemudian bilas pelan menggunakan air mengalir dan tiriskan.
- c) Preparat digenangi dengan menggunakan cat Gram B (lugol iodin) ± 60 detik, kemudian bilas pelan menggunakan air mengalir dan tiriskan.
- d) Preparat digenangi dengan menggunakan cat Gram C (alkohol-aseton) ± 30 detik, kemudian bilas pelan dengan air mengalir dan tiriskan.
- e) Preparat digenangi dengan menggunakan cat Gram D (safranin) ± 60 detik, kemudian bilas perlahan menggunakan air mengalir dan tiriskan.
- f) Diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x beri minyak imersi. Hasil yang ditemukan ialah Gambaran berwarna merah muda, berbentuk batang.

c. Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia

1) Uji Biokimia pada Media KIA

Koloni bakteri dari masing-masing media agar miring diinokulasikan pada media KIA menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menusuk lalu digoreskan sampai lereng media, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati hasil uji biokimia pada media KIA :

- a) *Escherichia coli* yaitu (A/A S (-) G (+)) yang dimana pada bagian lereng dan dasar berwarna kuning, tidak terbentuk warna hitam, dan menghasilkan gas ditandai dengan media yang pecah atau terangkat sedikit ke atas.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* yaitu (K/K S (-)) yaitu bagian lereng dan dasar berwarna merah (K atau Alkali) dan tidak membentuk warna hitam (S atau Sulfida).

2) Uji Biokimia pada Media SIM

Koloni bakteri dari masing-masing media agar miring diinokulasikan pada media SIM menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menusuk media, dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati hasil uji biokimia pada media SIM :

- a) *Escherichia coli* pada media SIM yaitu (- + +) yang mana pada bagian tusukan tidak ada warna hitam, pada permukaan media berwarna merah muda setelah pemberian erlic A dan erlic B, dan ada kekeruhan yang menyebar disekitar tusukkan.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* pada media SIM yaitu Sulfid (-), Indol (-), Motilitas (+) yang mana tidak terbentuk warna hitam, tidak terdapat warna merah muda pada permukaan media setelah penambahan erlic A dan B, dan terdapat pertumbuhan(kekeruhan) pada seluruh media.

3) Uji Biokimia pada Media LIA

Koloni bakteri dari masing-masing media agar miring diinokulasikan pada media LIA menggunakan ose jarum secara aseptis dengan menusuk lalu digoreskan sampai lereng media, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Diamati hasil uji biokimia pada media LIA :

- a) *Escherichia coli* yaitu (K/K/ S (-)/G (-)) yang dimana pada bagian lereng dan dasar berwarna ungu, tidak terbentuk warna hitam, dan tidak menghasilkan gas.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* pada media LIA yaitu (K/K S (-)) yaitu bagian lereng dan dasar berwarna ungu dan tidak membentuk warna hitam.

4) Uji Biokimia pada Media Citrat

Koloni bakteri dari masing-masing media *Endo Agar* dan *Pseudomonas Selective Agar* 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 :

- a) *Escherichia coli* adalah negatif (-) yang dimana media tetap berwarna hijau dan tidak berubah warna menjadi biru.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* pada media Citrat yaitu (+) yang mana media berubah dari warna hijau menjadi biru.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

- a) Isolat bakteri dari media agar miring diinokulasikan pada media cair *Brain Heart Infusion* (BHI).
- b) Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
- c) Diamati kekeruhan yang terjadi pada media BHI lalu dibandingkan dengan standar *Mc Farland* $0,5 = 1.5 \times 10^8$ cfu/ml, dengan cara membandingkan ketajaman garis hitam pada kartu *Mc Farland* (Munira *et al.*, 2018)

5. Uji Sensitivitas

- a) Kapas lidi steril dimasukkan pada media BHI yang berisi bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
- 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 37°C.
- e) Diamati adanya zona hambat dan diukur menggunakan jangka sorong.

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 adalah sebagai berikut :

Tabel 3. 1. Diameter Zona Hambat menurut CLSI

NO	Jenis Antibiotik	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Sensitif	Intermediet	Resistan
1	Gentamicin	≥ 18	15 – 17	≤ 14
2	Ampicilin	≥ 17	14 – 16	≤ 13
3	Ciprofloxacin	≥ 25	19 – 24	≤ 18
4	Imipenem	≥ 19	16 – 18	≤ 15

G. Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer. Data tersebut dilakukan dengan cara identifikasi bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada urine pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK) di Rumah Sakit UNS dan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik.

H. Teknik Analisis Data

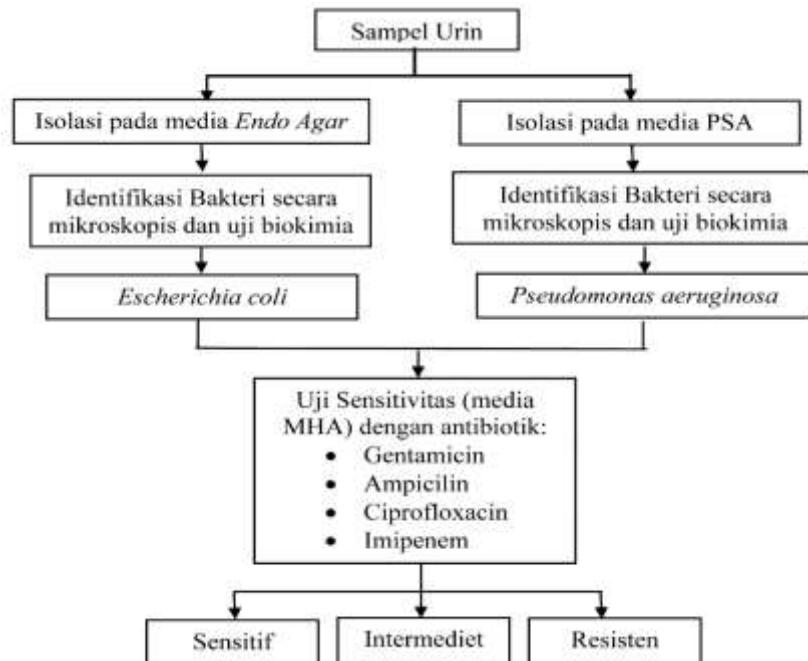
Data hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari sampel urine pasien ISK di Rumah Sakit UNS dianalisis dengan metode difusi, hasil dibandingkan dengan standar diameter zona hambat yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

I. Penyajian Data

Hasil uji ditampilkan dalam bentuk tabel sebagai berikut :

- Tabel Hasil Identifikasi Bakteri dari sampel urin penderita ISK.
- Tabel Hasil pengukuran dari diameter zona hambat yang dibandingkan dengan standar CLSI.

J. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Jalur Penelitian