

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi klinik di RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari suatu populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin hasil isolasi yang diambil secara acak dari urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih di RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari-April 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* dari urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari-April 2018.

Variabel utama kedua adalah uji sensitivitas *Escherichia coli* dari urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih terhadap antibiotik siprofloksasin, kotrimoksazol, fosfomisin, amoksisilin-klavulanat.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih yang diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik siprofloksasin, kotrimoksazol, fosfomisin, amoksisilin-klavulanat.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat cakram antibiotik siprofloksasin, kotrimoksazol, fosfomisin, amoksisilin-klavulanat terhadap bakteri *Escherichia coli* dari urin

pasien yang diduga infeksi saluran kemih di RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari-April 2019.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah laboratorium, peneliti, sterilisasi, media, peralatan, kemurnian bakteri, jumlah bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel urin adalah sampel yang diambil dari pasien yang diduga infeksi saluran kemih bawah oleh Laboratorium Mikrobiologi di RSUD Dr. Moewardi Surakarta

Kedua, *Escherichia coli* adalah bakteri dari urin pasien infeksi saluran kemih yang menunjukkan hasil identifikasi positif bakteri *Escherichia coli* secara morfologi koloni pada media selektif, mikroskopis, dan uji biokimia.

Ketiga, Isolasi adalah suatu proses memisahkan mikroorganisme dari mikroorganisme lainnya dengan cara goresan yang dilakukan pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB).

Keempat, Kertas cakram antibiotik kotrimoksazol adalah disc antibiotik yang mengandung agensia kimia kotrimoksazol 1,25/23,75 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Kelima, Kertas cakram antibiotik siprofloksasin adalah disc antibiotik yang mengandung agensia kimia siprofloksasin dengan dosis 5 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Keenam, Kertas cakram antibiotik fosfomisin adalah disc antibiotik yang mengandung agensia kimia fosfomisin dengan dosis 200 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Ketujuh, Kertas cakram antibiotik amoksisilin-klavulanat adalah disc antibiotik yang mengandung agensia kimia amoksisilin-klavulanat dengan dosis 20/10 µg yang didapat dari laboratorium Mikrobiologi.

Kedelapan, Uji sensitivitas antibiotik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui sensitivitas antibiotik kotrimoksazol, siprofloksasin, fosfomisin dan amoksisilin-klavulanat dengan metode difusi *Kirby-bauer* yang ditunjukkan

dengan zona jernih pada sekitar cakram antibiotik, kemudian dibandingkan dengan tabel *Zona Diameter Interpretive Standart Kirby -Bauer*.

Kesembilan, pola sensitivitas antibiotik adalah daya efektivitas dari suatu antibiotik dalam membunuh bakteri yang meliputi *resistant*, *intermediate*, dan *susceptible* (CLSI 2018).

Kesepuluh, resisten adalah dimana pada pemberian antibiotik dalam kadar hambat minimumnya tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Kesebelas, *intermediate* adalah dimana terjadinya pergeseran dari keadaan sensitif ke keadaan resisten tetapi tidak sepenuhnya resisten (Djide 2008).

Keduabelas, sensitif adalah dimana pada pemberian antibiotik dengan dosis lazim dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vial, bunsen, cawan petri steril, jarum ose, inkas, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, inkubator, objek glass, mikroskop, kapas lini steril, mikropipet, timbangan analitik, pipet volume, batang pengaduk, pinset, gelas ukur, labu takar, beker glass, dan penggaris.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Eschericia coli* dari urin pasien diduga infeksi saluran kemih di RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari – April 2019.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, NaCl, larutan standart *mc farland* (0,5), *Buffered Peptone Water*, reagen untuk pengecatan Gram yaitu Gram A (larutan kristal violet), Gram B (lugol's iodine), Gram C (etanol 95%), Gram D (safranin)

2.3 Media. Media yang digunakan adalah *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motulity* (SIM), *Kingler Iron Agar* (KIA), *Urea*, *Citrat*.

2.4 Pemanding. Bakteri pemanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi.

D. Jalannya penelitian

3. Persiapan alat dan bahan

Media yang digunakan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan dengan suhu 121⁰C selama 15 menit, setelah itu media didiamkan sampai suhu hangat kuku 50⁰C dan dituangkan kedalam cawan petri steril. Alat yang digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, botol penampung, beaker glass, gelas ukur dibungkus dengan kertas kemudian disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170⁰C selama 1 jam.

4. Isolasi bakteri

Urin dikeluarkan langsung dan ditampung ke dalam pot steril yang berisi *Buffered Peptone Water*, selanjutnya dilakukan penanaman atau menggoreskan dengan menggunakan jarum ose pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) dan di inkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu 37⁰C.

5. Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

3.1 Morfologi koloni pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB).

Sampel urin dilakukan penanaman dengan metode cawan gores (*Streak plate*) dengan menggunakan jarum ose pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB). kemudian di inkubasi dan diidentifikasi dengan pemeriksaan koloni. Pemeriksaan koloni dilakukan untuk mengamati ciri-ciri yang diduga *Escherichia coli* pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) ditandai dengan koloni berwarna merah dengan kilat logam berwarna hijau (metalik khas) koloni bulat dengan permukaan yang cembung dan halus, serta tepian rata.

3.2 Mikroskopis. Identifikasi *Escherichia coli* secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pertama, siapkan objek glass untuk membuat preparat. Pembuatan preparat dilakukan teknik smear, pilih koloni yang diduga koloni *Escherichia coli*. Tetesi sedikit dengan aquadest pada objek glass, diambil 1 ose bakteri dari koloni yang sudah dipilih, dilakukan pemerataan kemudian

preparat yang sudah dipilih, dilakukan pemerataan kemudian preparat yang sudah jadi difiksasi di atas spirtus. Kedua, tetesi dengan cat Gram A (*Kristal violet*) diamkan beberapa menit. Ketiga, tetesi dengan Gram B (*Lugol iodin*) diamkan selama 1-2 menit, kemudian dibilas. Keempat, tetesi dengan cat Gram C (*Alkohol*) diamkan 1–2 menit, kemudian dibilas dan keringkan. Kelima, tetesi dengan Gram D (*Safranin*) diamkan 1–2 menit kemudian dibilas dan keringkan. Kemudian hasilnya diamati di mikroskop. Pewarnaan Gram pada penelitian ini bertujuan untuk melihat morfologi dan bentuk sel tersebut. Apabila hasilnya menunjukkan positif akan terlihat bakterinya berwarna merah, bentuk batang, dan tampak bergerombol atau berpasangan.

3.3 Uji biokimia. Hasil pertumbuhan pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) diambil 1 koloni, lalu diuji pada media SIM, KIA, Urea, Citrat selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24–48 jam.

Medium SIM bentuknya semi solid, keadaan tegak, warna kuning muda. Biakan murni bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengujian yang digunakan adalah Sulfida, Indol, dan Motilitas. Hasil Sulfur negatif (-), Motility positif (+), Indol positif (+). Pada *Escherichia coli* yaitu uji sulfida bila media tidak berwarna hitam. Uji indol bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B. Uji motilitas bila terjadi pertumbuhan bakteri pada media.

Medium KIA bentuknya padat, keadaan miring, warna merah. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengujian yang digunakan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa) dan sulfida. Hasil A/AG S⁽⁻⁾ untuk *Escherichia coli* adalah bagian lereng akan berwarna kuning ditulis A, bagian dasar berwarna kuning ditulis A, media terangkat ke atas ditulis G, sulfida negatif tidak terbentuk warna hitam pada media ditulis S⁽⁻⁾.

Medium Urea bentuknya padat, keadaan tegak, warna kekuningan. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui bakteri yang memiliki enzim *urease*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan

kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Hasil negatif (-) untuk *Escherichia coli* yaitu tidak adanya perubahan warna.

Medium Citrat bentuknya padat, keadaan miring, berwarna hijau. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui kemampuan citrat sebagai sumber karbon utama. Uji positif apabila media berwarna biru. Hasil (-) untuk *Escherichia coli* yaitu media tetap berwarna hijau.

6. Pembuatan suspensi bakteri

Isolat dari media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) di inokulasi pada Nacl. Pertama diambil 1-2 ose dari media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi Nacl fisiologi steril sebanyak 10 ml lalu dihomogenkan dengan vortex. Kemudian kekeruhan suspensi biakan dibandingkan dengan standart *Mc Farland* 0,5 dengan jumlah sel setara dengan sel $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Suspensi ini akan digunakan untuk uji sensitivitas.

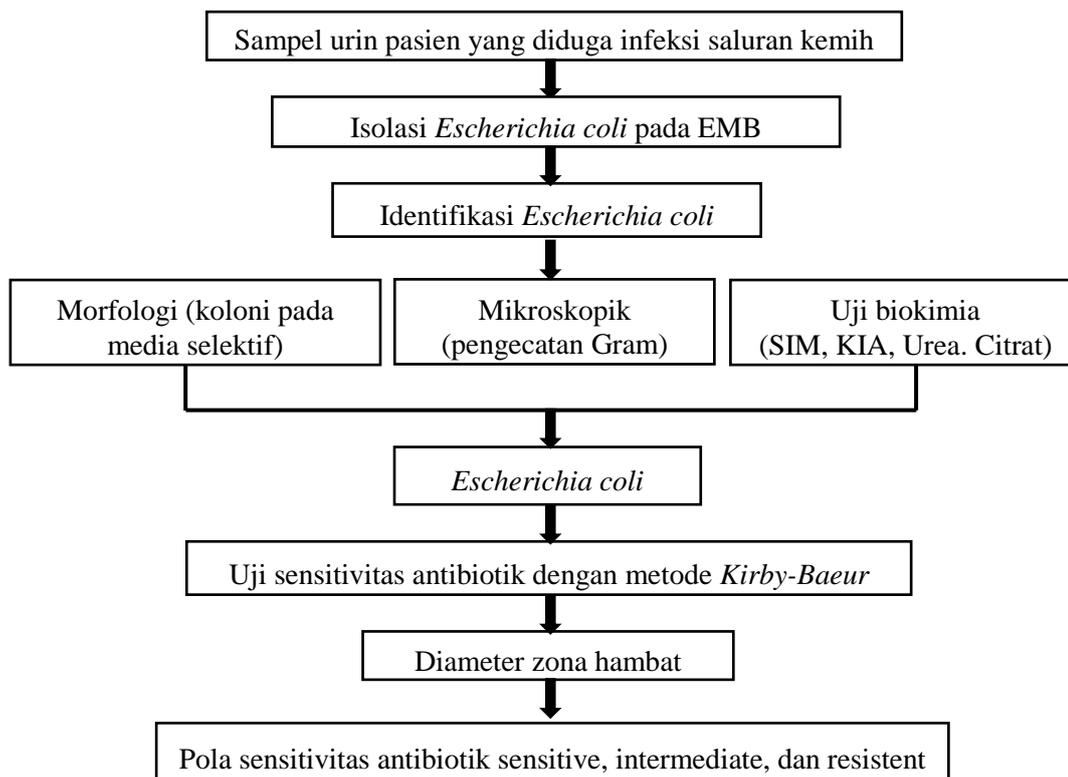
7. Cara pengujian sensitivitas

Pengujian dilakukan secara difusi dengan cara *Kirby-Bauer*. Pertama media MHA (*Muller Hinton Agar*) yang telah dicairkan dituang kedalam cawan petri steril dan tunggu hingga padat. Kedua, kapas lidi steril dimasukkan kedalam suspensi bakteri berdasarkan standart *Mc Farland* 0,5 kemudian diinokulasi kedalam media MHA dengan metode pemerataan (*Spread Plate Methode*) dan media didiamkan selama 10-15 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media, kemudian letakkan kertas cakram antibiotik pada media MHA dengan jarak yang sama. Ketiga, cawan petri di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat dan sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan persepuluh mm. Keempat, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Menurut CLSI Tabel penentuan Sensitivitas Antibiotik (diameter zona hambat dalam mm).

E. Analisis Data

Hasil penelitian berupa terdapat bakteri *Escherichia coli* dari urin pasien yang diduga infeksi saluran kemih pada RSUD Dr.Moewardi pada bulan Februari – April tahun 2019 serta diameter daya hambat antibiotik kotrimoksazol, siprofloksasin, fosfomisin dan amoksisilin-klavulanat dilakukan analisis secara statistik. Data diameter daya hambat dibandingkan dengan CLSI ditabulasi dan dipresentasikan. Data diameter daya hambat *Escherichia coli* hasil isolasi dibandingkan dengan *Escherichia coli* ATCC dilakukan pengujian dengan melihat standar deviasi dari semua data.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema Jalannya Penelitian