

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif, dimana penelitian ini akan mendeskripsikan ada tidaknya bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada urin pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni - Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah pasien-pasien yang dirawat inap dan rawat jalan yang menderita ISK di RSUP dr. Soeradji Tirtonegoro.

2. Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah 6 sampel :

- a. 4 urin midstream/urin porsi tengah
- b. 2 urin kateter

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan teknik purposive sampling.

a. Kriteria inklusi

- 1) Pasien yang terkena Infeksi Saluran Kemih (ISK)
- 2) Pasien rawat inap yang menggunakan kateter
- 3) Pasien rawat jalan yang terkena Infeksi Saluran Kemih (ISK)

b. Kriteria eksklusi

- 1) Pasien yang didiagnosis mengalami penyakit infeksi selain ISK

D. Variabel Penelitian

Variabel bebas di penelitian ini adalah urin penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK), sedangkan variabel terikatnya adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

E. Definisi Operasional

1. Pasien ISK adalah pasien yang menderita Infeksi Saluran Kemih
2. *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif yang mampu menyebabkan infeksi saluran kemih
3. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif yang mampu menyebabkan infeksi saluran kemih
4. Media MCA adalah media untuk media selektif dan media diferensial yang digunakan untuk mengisolasi bakteri batang Gram negatif berdasarkan kemampuan bakteri memfermentasi laktosa atau tidak. Media *Mac Conkey Agar* digunakan terutama untuk famili Enterobacteriaceae dan genus *Pseudomonas*.
5. Media PSA adalah Media selektif untuk menumbuhkan *Pseudomonas aeruginosa*
6. Pewarnaan Gram adalah pewarnaan untuk mengetahui morfologi dari bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*
7. Media Biokimia adalah media untuk memastikan bahwa menumbuhkan jenis bakteri yang diharapkan dari koloni media PSA dan media MCA

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Lampu spirtus, tabung reaksi, ose bulat, ose jarum, pot urine, spidol, inkubator, kapas alkohol, korek api, rak tabung, objek glas, mikroskop, deck glass, mikroskop dan kertas label.

2. Bahan

a. Sampel

Sampel yang akan digunakan untuk penelitian yaitu 6 urine (2 urin kateter dan 4 urin midstream/urin porsi tengah) pasien yang terinfeksi saluran kemih yang dilakukan pengambilan di RSUP dr. Soeradji Tirtonegoro.

b. Media

Media yang akan digunakan yaitu *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA), media *Mac Conkey Agar* (MCA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kligler's Iron Agar* (KIA), dan *Simmon's Citrate*

1) Pembuatan media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA)

Timbang 45 gram media PSA dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

2) Pembuatan media *Mac Conkey Agar* (MCA)

Timbang 51,53 gram media MCA dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

3) Pembuatan media *Kligler's Iron Agar* (KIA)

Timbang 57,52 gram media KIA dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

4) Pembuatan media *Sulfida Indol Motility* (SIM)

Timbang 30 gram media SIM dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

5) Pembuatan media *Lysine Iron Agar* (LIA)

Timbang 45 gram media LIA dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup

kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

6) Pembuatan media *Simmons Citrate*

Timbang 45 gram media *Simmons Citrate* dan tambahkan 1000 ml aquadest. Masukkan ke dalam tabung reaksi setelah dipanaskan hingga larut. Letakkan penutup kapas di atasnya dan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk disterilkan. Setelah media padat dingin, bungkus dengan kertas dan simpan di kulkas.

c. **Reagensia**

Reagensia yang akan digunakan yaitu aquadest steril, Gram A (*Crystal Violet*), Gram B (*Iodine/Lugol's Solution*), Gram C (*Alcohol 96%*), Gram D (*Safranin*), oil imersi, Erlich A, dan Erlich B.

G. Prosedur Penelitian

1. Cara Pengambilan Sampel

a. Urin porsi tengah (midstream)

Spesimen porsi tengah adalah metode yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan.

1) Pasien Wanita

- a) Cuci tangan dengan air mengalir dan sabun lalu keringkan dengan tisu.
- b) Lebarkan labia mayora dengan ibu jari dan telunjuk lalu labia dan vulva dibersihkan dengan kasa steril secara searah dari depan ke belakang.
- c) Bilas dengan air lalu keringkan dengan kasa steril lain.
- d) Keluarkan urine dan buang aliran urine pertama lalu segera tampung aliran urine selanjutnya pada wadah steril, hindari aliran urine mengenai wadah penampung.
- e) Wadah ditutup dengan rapat

2) Pasien Laki-laki

- a) Cuci tangan dengan air mengalir dan sabun lalu keringkan dengan tisu.

- b) Bagi pasien yang tidak dikhitan, ditarik kulit preputium (foreskin) ke belakang lalu bersihkan glans penis dengan air.
- c) Keluarkan urine dan buang urine aliran pertama lalu segera tampung aliran urine selanjutnya pada wadah steril, hindari aliran urine mengenai wadah penampung.
- d) Wadah ditutup dengan rapat (Ikatan Ahli Urologi Indonesia IAUI, 2020).

b. Urin kateter

- 1) Cuci tangan sesuai standar.
- 2) Gunakan APD sesuai standar dan siapkan alat yang digunakan.
- 3) Lakukan pendekatan pada pasien, identifikasi pasien, lalu verifikasi keadaan pasien. Selanjutnya berikan edukasi kepada pasien atau keluarga pasien tentang tindakan yang akan dilakukan.
- 4) Klem selang urine bag selama kurang lebih 15 menit.
- 5) Letakkan pernak di dekat lokasi pengambilan urine.
- 6) Desinfeksi lokasi penusukan/pengambilan urine dengan kapas alkohol 70%. Lokasi pengambilan spesimen yakni pada selang kateter dengan jarak kurang lebih 5 cm dari pertemuan antara kanal pertemuan dengan selang urine bag.
- 7) Tusuk dengan jarum pada catheter port dengan kemiringan sudut 90°.
- 8) Aspirasi urine sebanyak kurang lebih 5 cc lalu buang pada wadah tertentu.
- 9) Aspirasi urine kembali menggunakan spuit baru sebanyak kurang lebih 5 cc lalu pindahkan urine pada wadah steril.
- 10) Lepaskan klem penjepit.
- 11) Cuci tangan dengan air mengalir dan sabun lalu keringkan dengan tisu.
- 12) Beri identitas pasien dan spesimen pada spuit (Ikatan Ahli Urologi Indonesia IAUI, 2020).

2. Isolasi bakteri pada *Mac Conkey Agar* dan *Pseudomonas Selektive Agar*

- a. Urin disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
- b. Supernatan dibuang, lalu celupkan ose steril ke dalam endapan/sedimen dan inokulasikan pada media selektif deferensial, yaitu *Mac Conkey Agar* digunakan untuk bakteri *Escherichia coli*, sedangkan *Pseudomonas Selektif Agar* digunakan untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- c. Kedua media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada media MCA, koloni *Escherichia coli* akan tampak berwarna merah muda atau merah, berbentuk bulat, cembung, dengan tepi rata. Sedangkan di media PSA, koloni *Pseudomonas aeruginosa* akan terlihat warna fluoresensi kehijauan, koloni bulat, cembung, kering, dan memiliki tepi rata.

3. Identifikasi bakteri pada pewarnaan Gram

Sampel isolat dari media MCA dan PSA diambil dengan satu ose, kemudian dibuat preparat dan dilakukan pewarnaan Gram..

- a. *Crystal Violet* (Gram A) diteteskan ke objek glass ditunggu 1 menit, kemudian cuci dengan air.
- b. *Iodine/Lugol's Solution* diteteskan ke objek glass ditunggu (Gram B) ditunggu 1 menit kemudian cuci dengan air.
- c. *Alcohol 96%* (Gram C) diteteskan ke objek glass ditunggu 30 detik sambil di goyang – goyangkan kemudian cuci dengan air.
- d. Safranin (Gram D) diteteskan ke objek glass ditunggu selama 1 menit lalu cuci dengan air. Di bawah mikroskop, bakteri berbentuk *basil* akan terlihat warna merah (Gram negatif), sedangkan bakteri berbentuk *coccus* akan tampak warna ungu (Gram positif)..

4. Identifikasi bakteri dengan uji biokimia

Identifikasi *Escherichia coli* dilakukan berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media LIA, SIM, KIA, dan sitrat. Inokulasi ke media KIA dengan ditusuk gores, media SIM dengan ditusuk , media LIA dengan ditusuk gores dan media Citrat dengan digores.

- a. Media KIA (*Kligler's Iron Agar*) berfungsi untuk mengetahui bakteri yang memfermentasikan laktosa dan glukosa serta pembentukan H_2S atau tidak. Pada media KIA, bagian lereng tampak berwarna kuning (A) dan bagian dasar juga berwarna kuning (A), adanya rongga udara (G+) dan tidak membentuk warna hitam (S-).

Hasilnya KIA : A/AG S^-

- b. SIM (*Sulfida Indol Motility*) digunakan untuk melihat pergerakan kuman dan terbentuk sulfida asam (S-), maka media tetap berwarna kuning. Indol (I+) dapat terdeteksi jika setelah penambahan Erlich A dan Erlich B, permukaan media berubah menjadi merah. Motil (M+) menunjukkan pertumbuhan bakteri yang menyebar di seluruh media.

Hasilnya SIM : -++

- c. Media LIA (*Lysine Iron Agar*) berfungsi untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam mendeaminasi lysine, dan membentuk H_2S . Pada media LIA, bagian lereng berwarna merah (K), bagian dasar juga berwarna merah (K) dan tidak membentuk warna hitam (S). Hasilnya LIA : K/K S^-

- d. Media *Simmon's Citrate Agar* berfungsi untuk mengidentifikasi apakah bakteri dapat memanfaatkan sitrat untuk menjadi satu-satunya sumber karbon. Pada medium sitrat akan tetap berwarna hijau (-). Hasilnya sitrat : -

Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan uji biokimia, media yang digunakan adalah media LIA, SIM, KIA, dan sitrat. Inokulasi ke media KIA dengan ditusuk gores, media SIM dengan ditusuk, media LIA dengan ditusuk gores dan media sitrat dengan digores.

- a. Medium KIA (*Kligler's Iron Agar*) berfungsi untuk mengetahui bakteri yang memfermentasikan laktosa dan glukosa serta pembentukan H_2S atau tidak. Pada medium KIA bagian lereng tampak berwarna merah (K) dan bagian dasar juga berwarna merah (K) dan tidak membentuk warna hitam (S-).

Hasilnya KIA : K/K S^- .

- b. SIM (*Sulfida Indol Motility*) digunakan untuk melihat pergerakan kuman dan terbentuk sulfida asam (S-), maka

media tetap berwarna kuning. Indol (I+) dapat terdeteksi jika setelah penambahan Erlich A dan Erlich B, permukaan media berubah menjadi merah. Motil (M+) menunjukkan pertumbuhan bakteri yang menyebar di seluruh media.

Hasilnya SIM : --+

- c. Media LIA (*Lysine Iron Agar*) untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam mendeaminasi lysine, dan membentuk H₂S. Pada media LIA, bagian lereng berwarna merah (K), bagian dasar juga berwarna merah (K) dan tidak membentuk warna hitam (S-).

Hasilnya LIA : K/K S⁻

- d. Media *Simmons's Citrate Agar* berfungsi untuk mengidentifikasi apakah bakteri dapat memanfaatkan sitrat untuk menjadi satu-satunya sumber karbon. Pada medium citrat akan berubah berwarna biru (+).

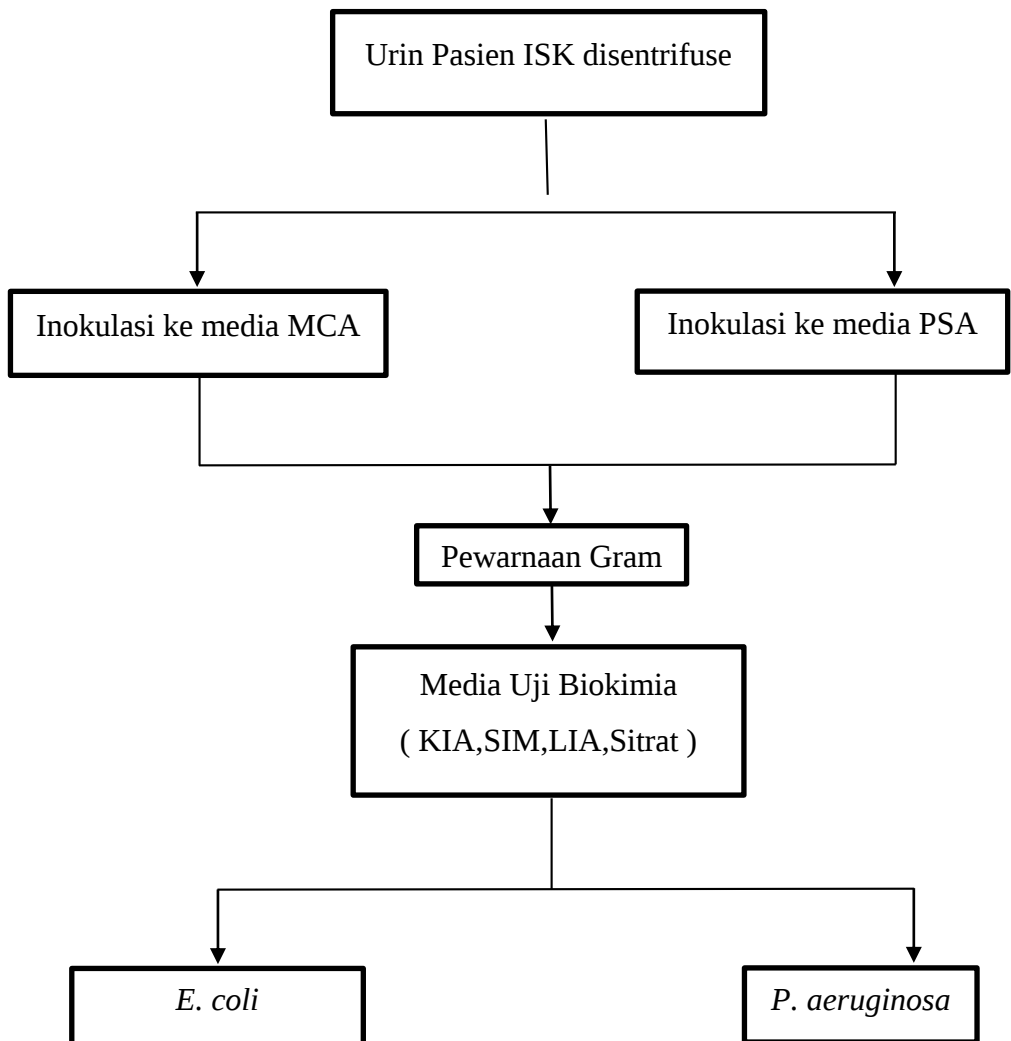
Hasilnya sitrat : +

H. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan metode primer. Data primer dikumpulkan dengan cara mengidentifikasi *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada pasien yang terinfeksi saluran kemih di RSUP dr. Soeradji Tirtonegoro.

I. Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan secara manual dan deskriptif dengan menggunakan tabel dan pembahasan berdasarkan interpretasi hasil .

J. Alur Penelitian**Gambar 3. 1 Alur Penelitian**