

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif yang bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai pola sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap satu jenis antibiotik dari sampel urin pasien dengan penyakit yang mempunyai faktor resiko tinggi terinfeksi infeksi saluran kemih di RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang pada satu periode waktu tertentu tanpa memberikan perlakuan khusus.

B. Tempat dan waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada dua lokasi. Pengambilan sampel dilakukan di RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang, sedangkan pemeriksaan kultur bakteri dan uji sensitivitas antibiotik dilakukan di Laboratorium Prodi D-III Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari-Mei 2026

C. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang dianalisis adalah tingkat sensitivitas *E.coli* yang diisolasi dari sampel urin pasien dengan penyakit yang mempunyai faktor resiko tinggi terinfeksi ISK di RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang terhadap antibiotik ciprofloxacin.

D. Populasi, Sampel dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari seluruh sampel urin pasien dengan penyakit yang memiliki faktor resiko tinggi mengalami ISK yang masuk dan diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang selama periode penelitian, dengan jumlah total 18 sampel urin.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini terdiri dari isolat bakteri *E.coli* yang diperoleh dari hasil kultur dan identifikasi terhadap 18 sampel urin pasien dengan penyakit yang memiliki faktor resiko tinggi mengalami infeksi saluran (ISK). Dari hasil pemeriksaan tersebut diperoleh sebanyak 5 isolat *E.coli* yang memenuhi kriteria penelitian dan digunakan sebagai sampel penelitian.

3. Teknik Sampling

Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan teknik consecutive sampling, yaitu seluruh sampel urin pasien dengan penyakit yang memiliki faktor resiko tinggi mengalami infeksi saluran (ISK) yang masuk dan diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang selama periode penelitian dikumpulkan secara berturut-turut sesuai urutan penerimaan sampel. Seluruh sampel urin tersebut kemudian dilakukan kultur dan identifikasi bakteri. Sampel yang teridentifikasi mengandung bakteri

E.coli serta memenuhi kriteria penelitian akan dipilih sebagai sampel penelitian hingga jumlah sampel yang dibutuhkan terpenuhi, yaitu sebanyak 5 isolat.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
1. Isolasi bakteri <i>Escherichia coli</i>	Proses pemisahan dan penanaman bakteri <i>E. coli</i> dari sampel urin pasien dengan penyakit yang mempunyai faktor resiko tinggi terkena infeksi saluran kemih (ISK) untuk mendapatkan koloni murni yang dapat diidentifikasi dan diuji sensitivitasnya.	Media agar, inkubator, uji biokimia (IMVIC). -Emba : bulat halus, hijau metalik -MCA : bulat halus, merah muda -Indol : Positif (+) -Methyl Red : Positif (+) -Voges-Proskauer : Negatif (-) -Citrate : Negatif (-)	<i>E.coli</i> teridentifikasi berdasarkan hasil kultur, pewarnaan gram, dan uji IMVIC/ tidak teridentifikasi	Nominal
2. Pola sensitivitas <i>E.coli</i> terhadap antibiotik	Kemampuan isolat <i>E. coli</i> dari sampel urin pasien dengan penyakit yang mempunyai faktor resiko tinggi terkena ISK untuk dihambat oleh antibiotik ciprofloxacin berdasarkan diameter zona hambat.	Media kultur MHA, disk antibiotik, jangka sorong/penggaris zona, pedoman CLSI	-Sensitif (S) ≥ 26 mm -Intermediet (I) 22-25 mm -Resisten (R) ≤ 21 mm	Ordinal

F. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

- a. Survei lokasi
- b. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Program Studi Teknologi Laboratorium Medis dengan Nomor Surat LB.02.03/1/0006/2026
- c. Penelitian ini telah memperoleh surat izin penelitian dari Program Studi Teknologi Laboratorium Medis dengan Nomor Surat PP.06.02/F.XXIX/1772/2026
- d. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang dengan Nomor Surat 445/1177/RSUD3.1
- e. Peneliti telah melakukan pemaparan proposal dan telaah etik di RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang pada tanggal 14 April 2026 sebagai salah satu tahapan yang harus dipenuhi sebelum pelaksanaan penelitian.

2. Tahap Pelaksanaan

Melaporkan diri, mengajukan izin penelitian, pengurusan etik penelitian, dan presentasi proposal kepada pihak RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang. Setelah memperoleh izin dan mendapatkan surat layak dari Rumah Sakit, peneliti menggunakan sampel urin tersimpan pasien infeksi saluran kemih yang tersedia di laboratorium sesuai dengan kriteria penelitian.

3. Tahap Pemeriksaan

- a. Alat : Api Bunsen, autoklaf (All American 75X), beaker glass, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, handscoon, hot plate (Ika C MAG HP 7) , incubator (Memmert IN55), kaki tiga, kapas lidi steril, kawat kasa, kulkas, laminar air flow (LAF), mikroskop (Olympus CX23), objek glass, ose, penjepit tabung, pipet tetes, pinset, pipet volume, rak pewarnaan, rak tabung, sendok tanduk, tabung reaksi, timbangan analitik (VIBRA SHINKO DENSHI), dan tissue.
- b. Bahan : Sampel urin pasien ISK, Alcohol 96%, aluminium foil, antibiotik ciprofloxacin 30 µg, aquadest steril, cat gram, standart Mc Farlan 0,5, media MacConkey Agar/MCA (Merck, Jerman, VM952705101), media Mueller-Hinton Agar/MHA (Merck, Jerman, VM1051772322), media Eosin Methylen Blue/EMBA (Merck, Jerman, VM952858102), media Nutrient Agar (NA), media MR-VP Broth, media Simmons Citrate Agar, reagen Indole (Kovac's reagent), reagen Methyl Red, reagen α -naphthol dan KOH, reagen Citrate, dan NaCl 0,9%.

4. Prosedur Pemeriksaan

a. Pembuatan Media

1) Pembuatan media MHA (Mueller-Hinton Agar)

Media Mueller Hinton Agar (MHA) disiapkan dengan menimbang sebanyak 3,8 gram serbuk MHA dan memasukkannya ke dalam erlenmeyer berkapasitas 250 mL. Ditambahkan 100 mL akuades sambil dikocok hingga tercampur merata, dipanaskan hingga mendidih untuk melarutkan seluruh komponen media. Setelah larutan homogen, erlenmeyer ditutup menggunakan kapas. Media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120°C selama 15 menit dengan klep pipa tertutup rapat. Setelah proses sterilisasi selesai, klep pipa dibuka perlahan agar suhu turun secara bertahap. Media steril kemudian dikeluarkan dari autoklaf dan dituangkan secara aseptik ke dalam cawan Petri steril, lalu dibiarkan hingga memadat sebelum digunakan untuk pengujian. (Wardaniati & Gusmawarni, 2021).

2) Pembuatan media MCA (*MacConkey Agar*) dan Media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*)

Media MacConkey Agar (MCA) disiapkan dengan menimbang bahan sesuai prosedur yang terdapat pada label kemasan atau sesuai dengan kebutuhan, dicampurkan dalam aquades di dalam gelas beker. Campuran media dipanaskan di atas hotplate sambil

diaduk hingga larut dan homogen. Setelah itu, larutan media dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup menggunakan kapas untuk mencegah kontaminasi. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu dan tekanan standar selama waktu yang telah ditentukan. Setelah proses sterilisasi selesai, media dikeluarkan dan dituangkan secara aseptik ke dalam cawan Petri steril. Media dibiarkan hingga memadat, lalu dibungkus dengan plastik dan disimpan di dalam lemari pendingin hingga waktu penggunaan. Pembuatan media EMBA dilakukan dengan prosedur yang serupa dengan petunjuk penggunaan media yang berlaku (Situmorang & Manihuruk, 2020).

3) Isolasi bakteri

a) Pengambilan sampel

Sampel urin dikumpulkan dari pasien dengan penyakit yang memiliki faktor resiko terkena ISK di RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang menggunakan metode urin porsi tengah (midstream urine) pada pagi hari. Pengambilan dilakukan dengan wadah penampung urin steril untuk menghindari kemungkinan kontaminasi. Kemudian sampel langsung dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Prodi DIII Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kupang untuk dilakukan kultur dan uji sensitivitas lebih lanjut.

b) Isolasi bakteri pada media MCA

Sebelum memulai pemeriksaan, seluruh alat dan bahan yang dibutuhkan dipersiapkan serta dipastikan dalam kondisi steril, lengkap, dan siap digunakan. Ose kemudian dipanaskan menggunakan nyala api bunsen hingga berpijar merah, selanjutnya didinginkan beberapa saat sebelum digunakan. Sebanyak 0,05mL sampel urin diambil secara aseptik, kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan media menggunakan ose steril. Selama proses inokulasi, pekerjaan dilakukan di sekitar nyala api bunsen untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi. Setelah penanaman selesai, ose kembali disterilkan dengan dipijarkan hingga merah. Media yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam (Endriani *et al.*, 2012).

c) Inokulasi pada media EMBA

Sebelum proses inokulasi dimulai, seluruh alat dan bahan yang diperlukan dipersiapkan terlebih dahulu, meliputi ose, bunsen, rak tabung, media EMBA, serta media MCA yang telah menunjukkan pertumbuhan hasil inokulasi sebelumnya. Setelah seluruh perlengkapan siap digunakan, ose disterilkan dengan memanaskan pada nyala api bunsen hingga berpijar merah, kemudian didiamkan beberapa saat

sampai suhunya menurun. Selanjutnya, cawan petri yang berisi media EMBA dibuka secukupnya dengan tutup cawan tetap diposisikan di atas media untuk meminimalkan resiko kontaminasi dari udara sekitar. Ambil sedikit biakan dari media MCA menggunakan ose steril, kemudian inokulasikan pada permukaan media EMBA. Setelah penanaman selesai, ose kembali disterilkan dengan cara dipijarkan. Media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 hingga 48 jam untuk pertumbuhan koloni bakteri (Arivo, 2017).

d) Pengecetan Gram

Sebelum proses pewarnaan, object glass yang akan digunakan dibersihkan menggunakan alkohol agar bebas dari lemak. Selanjutnya, dibuat apusan bakteri tipis pada permukaan object glass, dikeringkan dan difiksasi dengan pemanasan ringan untuk menempelkan sel bakteri pada kaca objek. Setelah preparat siap, olesan diberi larutan kristal violet (Gram A) secara merata dan dibiarkan selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Selanjutnya adalah penambahan larutan iodine (Gram B) untuk mengikat zat warna primer di dalam dinding sel bakteri, dibiarkan selama 1 menit dan dicuci kembali dengan air. Proses selanjutnya adalah dekolonisasi dengan etil

alkohol 93% atau (Gram C) selama 15–25 detik yang berfungsi untuk menghilangkan warna dari sel yang tidak mampu mempertahankan zat warna kristal violet, lalu preparat dicuci kembali dengan air mengalir. Setelah itu, dilakukan pewarnaan pembanding dengan meneteskan larutan safranin (Gram D) selama 45 detik, diikuti pembilasan menggunakan air mengalir, lalu preparat di biarkan mengering. Setelah kering, preparat diamati di bawah mikroskop cahaya untuk membedakan bakteri Gram positif (berwarna ungu) dan Gram negatif (berwarna merah muda) (Tivani *et al.*, 2019).

e) Uji fisiologis bakteri (uji biokimia)

Sebelum melakukan pengujian, terlebih dahulu dipersiapkan alat dan bahan yang diperlukan, Suspensi bakteri diinokulasikan pada media biokimia, diantaranya Indol, SIM, MR-VP, Citrat. Setelah itu tabung ditutup menggunakan kapas steril, kemudian diinkubasi pada suhu optimal yaitu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi berakhir, dilakukan penambahan reagen sesuai dengan jenis media yang digunakan. Pada media SIM, ditambahkan 3 tetes reagen Kovac's untuk mengamati perubahan warna yang menunjukkan hasil uji indol. Pada media MR, diteteskan larutan metil red untuk melihat reaksi positif atau

negatif. Untuk media VP, ditambahkan reagen KOH 10%, kemudian dikocok, diikuti dengan penambahan reagen Barritt, dan dibiarkan selama kurang lebih 10 menit sebelum dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna yang terjadi. Sementara itu, media sitrat dapat diamati langsung tanpa penambahan reagen untuk melihat adanya perubahan warna sebagai hasil reaksi pertumbuhan bakteri (Situmorang & Manihuruk, 2020).

f) Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli*

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan untuk mendapatkan tingkat kekeruhan yang sesuai dengan standar McFarland. Proses ini diawali dengan menyiapkan kawat ose yang telah disterilkan. Selanjutnya, menggunakan ujung kawat ose tersebut, diambil koloni bakteri *E.coli* yang telah tumbuh pada media sebelumnya, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9%. Suspensi dihomogenkan hingga tingkat kekeruhannya menyerupai standar kekeruhan larutan McFarland yang digunakan sebagai acuan (Wardaniati & Gusmawarni, 2021).

4) Uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik

Uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik dilakukan menggunakan metode difusi cakram sesuai rekomendasi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Hasil dari pembuatan suspensi bakteri sebelumnya diinokulasikan merata pada permukaan media Mueller Hinton agar menggunakan kapas lidi steril dan dibiarkan selama 5 menit hingga permukaan media tampak kering. Setelah itu, cakram antibiotik diletakkan di atas media yang telah ditanami, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian dapat berupa zona hambat (clear zone) diukur dengan menggunakan caliper atau jangka sorong, kemudian dikategorikan sebagai sensitif, intermediet, atau resisten berdasarkan kriteria interpretasi CLSI (Endriani *et al.*, 2012).

G. Analisis Hasil

Analisis data pada penelitian ini dilakukan melalui tahapan sebagai berikut:

1. Hasil uji sensitivitas antibiotik diinterpretasikan berdasarkan kriteria diameter zona hambat sesuai pedoman *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* untuk metode difusi cakram (difusi disk).
2. Melakukan analisis univariat, yaitu menggambarkan hasil pengukuran sensitivitas antibiotik dalam bentuk tabel dan persentase untuk setiap kategori respon (S, I, R).