

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian ini adalah penelitian Deskriptif. Hal ini dikarenakan tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui prevalensi pasien ISK dan untuk mengetahui jenis bakteri apa saja yang terdapat dalam urin pasien yang menggunakan kateter pada hari ke 1 & 4 yang dirawat di ruang rawat inap kelas I, II dan III RSUD Dr. H. Abdul Moeloek.

### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Pengambilan sampel dilakukan di ruang rawat inap kelas I, II dan III RSUD Dr. H. Abdul Moeloek. Pemeriksaan serta analisis sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dan pengumpulan data dilakukan pada bulan Oktober–Desember 2014

### **3.3 Alat dan Bahan**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung erlenmeyer, ose bulat dan ose jarum, spuit 3 ml, gelas kimia, lampu bunsen, pipet tetes, autoklaf, kaca objek, kaca

penutup/*cover glass* dan, mikropipet, mikroskop, inkubator, dan alat-alat lain yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi.

Bahan yang dipakai dalam penelitian antara lain nutrien agar, SIM (sulfur, indol, motilitas) agar, glukosa, TSIA (triple sugar iron agar), Simon Citrat agar, bahan pewarnaan Gram (kristal violet, iodine, alkohol 70%, safranin), aquades, dan bahan lain yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi

### **3.4 Subjek Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah semua pasien yang dirawat di ruang rawat inap kelas I, II&III RSUD Dr. H. Abdul Moeloek. Sampel penelitian adalah pasien yang menggunakan kateter yang ada di ruang rawat inap kelas I,II&III RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung.

##### **a. Kriteria inklusi**

1. Pasien yang dirawat inap di ruang rawat inap kelas I II dan III yang menggunakan kateter > 3 hari
2. Dirawat di rumah sakit lebih dari 2x24 jam
3. Berusia > 18 tahun

##### **b. Kriteria eksklusi**

1. Pasien yang dirawat selain di ruang rawat inap kelas I, II&III RSUD Dr. H. Abdul Moelek Bandar Lampung.
2. Pasien yang tidak bersedia dilakukan pengambilan urin kateter

### 3.4.2 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang di gunakan dalam penelitian ini adalah teknik *consecutive sampling*, yaitu semua pasien yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan ke dalam penelitian sampai jumlah minimal terpenuhi (Notoatmojo, 2010)

### 3.4.3 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan rumus Lameshow, yaitu:

Keterangan :

$n$  = jumlah sampel minimal yang di inginkan

$Z\alpha$  = derivat baku alpa (90%), derajat kepercayaan yang diinginkan

$P$  = proporsi kategori yang diteliti berdasarkan sumber 50%

$q$  =  $1-p$

$d$  = persisi (15%), derajat penyimpangan yang diinginkan

$$n = \frac{Z\alpha^2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

$$n = \frac{1,64^2 \cdot 0,5 \cdot 0,5}{0,15^2}$$

$$n = 29,88 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 30$$

jadi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 orang (Notoatmojo, 2010).

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Prosedur Pembenihan**

Untuk pengambilan sample dilakukan dengan pengambilan urin pasien yang menggunakan kateter di ruang rawat inap kelas I, II & III RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung. Kemudian lempeng agar nutrien digunakan sebagai media perbenihan untuk pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif. Setelah diketahui sifat bakteri dengan pewarnaan Gram, maka untuk pembiakan Gram positif digunakan agar darah dan untuk Gram negatif digunakan agar Mac Conkey.

#### **3.5.2 Pengambilan Spesimen Urin Kateter**

1. S spuit 3 ml disposable disiapkan untuk pengambilan urin kateter.
2. Selang drainase diklem selama 30 menit sebelum dilakukan pengambilan sampel urin. Pembendungan ini dilakukan untuk mempermudah dalam pengumpulan spesimen urin.
3. Selanjutnya peneliti mencuci tangan, menggunakan sarung tangan bersih dan botol spesimen diberi label.
4. Daerah kateter yang akan ditusuk yaitu daerah distal selang karet kateter menuju balon dibersihkan dengan desinfektan (alkohol 70%) dan ditunggu hingga kering.
5. Selang kateter urin ditusuk dengan sudut 30-45° dan dilakukan pengambilan spesimen urine pada selang kateter urine pasien sebanyak 3 ml.

6. Selang tempat dilakukan pengambilan spesimen didisinfeksi kembali dengan menggunakan alkohol 70%
7. Selanjutnya klem pada selang drainase dibuka
8. Spesimen urin dipindahkan dari spuit ke botol urine steril dan ditempatkan pada botol spesimen ke dalam plastik.
9. Spesimen segera dikirim ke laboratorium dalam waktu 15-20 menit (Indryan, 2010).

### **3.5.3 Penanaman dan Pemiakan**

Sampel urin diambil menggunakan mikropipet yang telah ditera setara dengan 0,02 ml urin lalu ditebarkan pada media NA, lalu diinkubasi dengan keadaan terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah koloni. Jumlah koloni yang dihitung dikalikan 50 untuk menentukan jumlah bakteri per ml urin. Bila hasil yang didapatkan >100.000/ml urin koloni yang tumbuh tersebut dilakukan pewarnaan Gram. Setelah diketahui sifat Gram nya, koloni bakteri kembali ditanam pada media Mac Conkey untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif dan media agar darah untuk mengidentifikasi bakteri Gram positif, kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia antara lain : Uji Katalase, Tes DNase, Uji Fermentasi glukosa, Uji TSIA, Uji Sitrat, dan Uji SIM. (Indryan, 2010).

### 3.5.4 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan penanaman koloni bakteri di media agar darah untuk pembiakan bakteri gram positif dan media agar Mac Conkey untuk pembiakan bakteri gram negatif. Diawali dengan mengambil koloni menggunakan ose, diratakan di seluruh permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Soemarno, 2003).

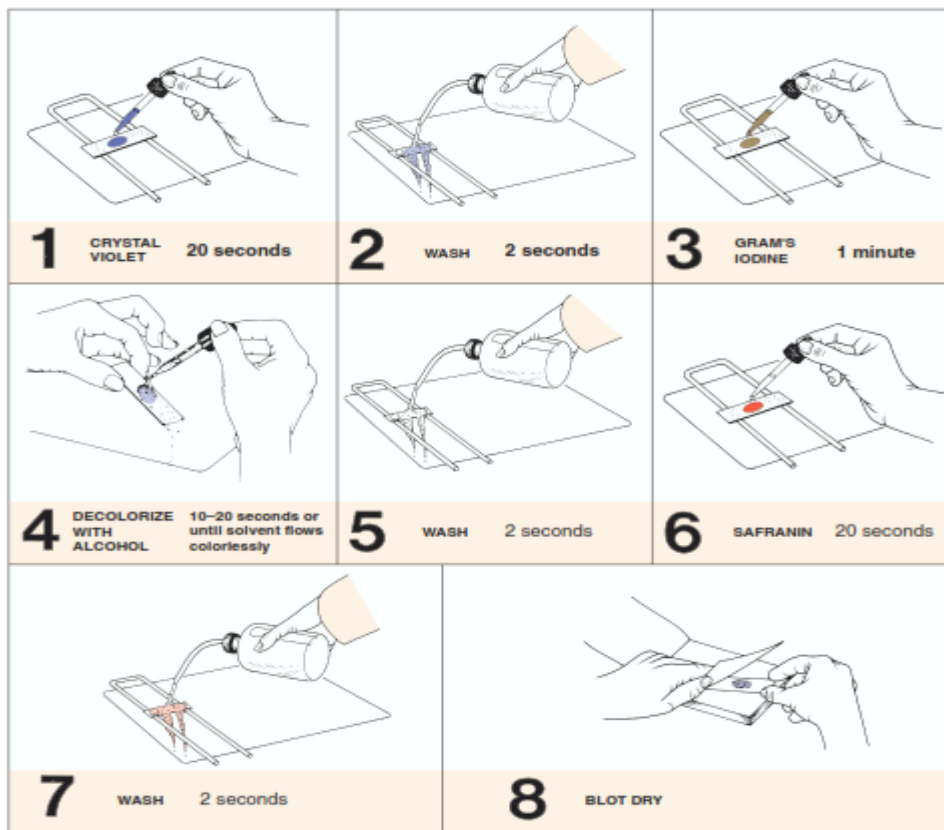
### 3.5.5 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram dan tes biokimiawi. Untuk bakteri Gram positif akan dilakukan uji biokimia antara lain : Uji Katalase, Tes DNase dan Uji Glukosa. Sedangkan untuk bakteri Gram negatif akan dilakukan uji biokimia antara lain : Uji TSIA, Uji Sitrat dan Uji SIM.

#### 1. Langkah kerja pewarnaan gram :

- a) Kaca objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api Bunsen sehingga bebas dari kotoran
- b) Ose dipanaskan dengan cara di lewatkan di atas api bunsen, kemudian ditunggu hingga sedikit dingin.
- c) Olesan tipis isolat bakteri dibuat dengan jarum ose secara aseptis pada gelas objek.
- d) Spesimen di fiksasi dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak tiga kali.

- e) Kristal violet (Gram A = cat utama) di teteskan pada gelas objek sampai menutupi seluruh sediaan. Kemudian di diamkan selama 20-30 detik, lalu di cuci dengan air mengalir.
- f) Kemudian ditetesi dengan larutan iodin (Gram B = larutan mordan), dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci pada air mengalir hingga tetesan menjadi bening.
- g) Selanjutnya dilakukan dekolorisasi dengan ditetesi etil alkohol 95% (Gram C) selama 20-30 detik atau sampai terlihat adanya warna yang luntur
- h) lalu di aliri dengan air selam beberapa detik untuk menghentikan aktivitas dekolorisasi.
- i) Selanjutnya bakteri ditetesi dengan safranin selama 20-30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir selama beberapa detik untuk menghabiskan sisa-sisa cat sampai bersih dan dikeringkan.
- j) Setelah itu diamati dengan mikroskop untuk melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap zat warna.
- k) Apabila bakteri terlihat berwarna ungu, menandakan bahwa bakteri tersebut bakteri gram positif. Apabila bakteri terlihat berwarna merah, menandakan bahwa bakteri tersebut bakteri gram negatif (Benson, 2007).



**Gambar 2.** Pewarnaan Gram (Benson, 2007)

## 2. Uji biokimia.

### a. Uji Katalase

Uji ini dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*. Hal ini dikarenakan *Staphylococcus sp* adalah kuman yang sering ditemukan mencemari udara ruang operasi. Cairan  $H_2O_2$  ditetesi pada kaca objek pada koloni yang diambil sebanyak satu ose. Hasil positif apabila terdapat gelembung udara yang menandakan *Staphylococcus sp*. dan hasil negatif apabila tidak terdapat gelembung udara yang menandakan *Streptococcus sp*. (Steven *et al*, 2004).



b. Uji DNase

Kultur bakteri ditanam pada DNase agar plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh digenangi dengan HCl 10% selama 1-2 menit. Kemudian diamati. Hasil positif bila ditemukan zona bening disekitar koloni yang menandakan *Staphylococcus aureus* dan negatif apabila tidak ditemukan zona bening disekitar koloni yang menandakan spesies *Staphylococcus* yang lain (Soemarno, 2003)

c. Uji Glukosa

Uji ini didasarkan atas kemampuan bakteri untuk memfermentasi glukosa. Tujuan dari uji gula-gula ini adalah untuk mengetahui bakteri yang menghasilkan gas dan asam. Jika hasil positif ditandai dengan terjadinya perubahan dari biru menjadi hijau atau kuning menandakan bakteri tersebut menghasilkan asam, serta adanya gelembung udara pada tabung Durham menandakan bakteri tersebut menghasilkan gas (Steven *et al*, 2004).

d. Uji SIM

Agar SIM merupakan agar semisolid yang digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfide, timbulnya indol akibat enzim *tryptophanase* yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta motilitas atau pergerakan bakteri (Steven *et al*, 2004).

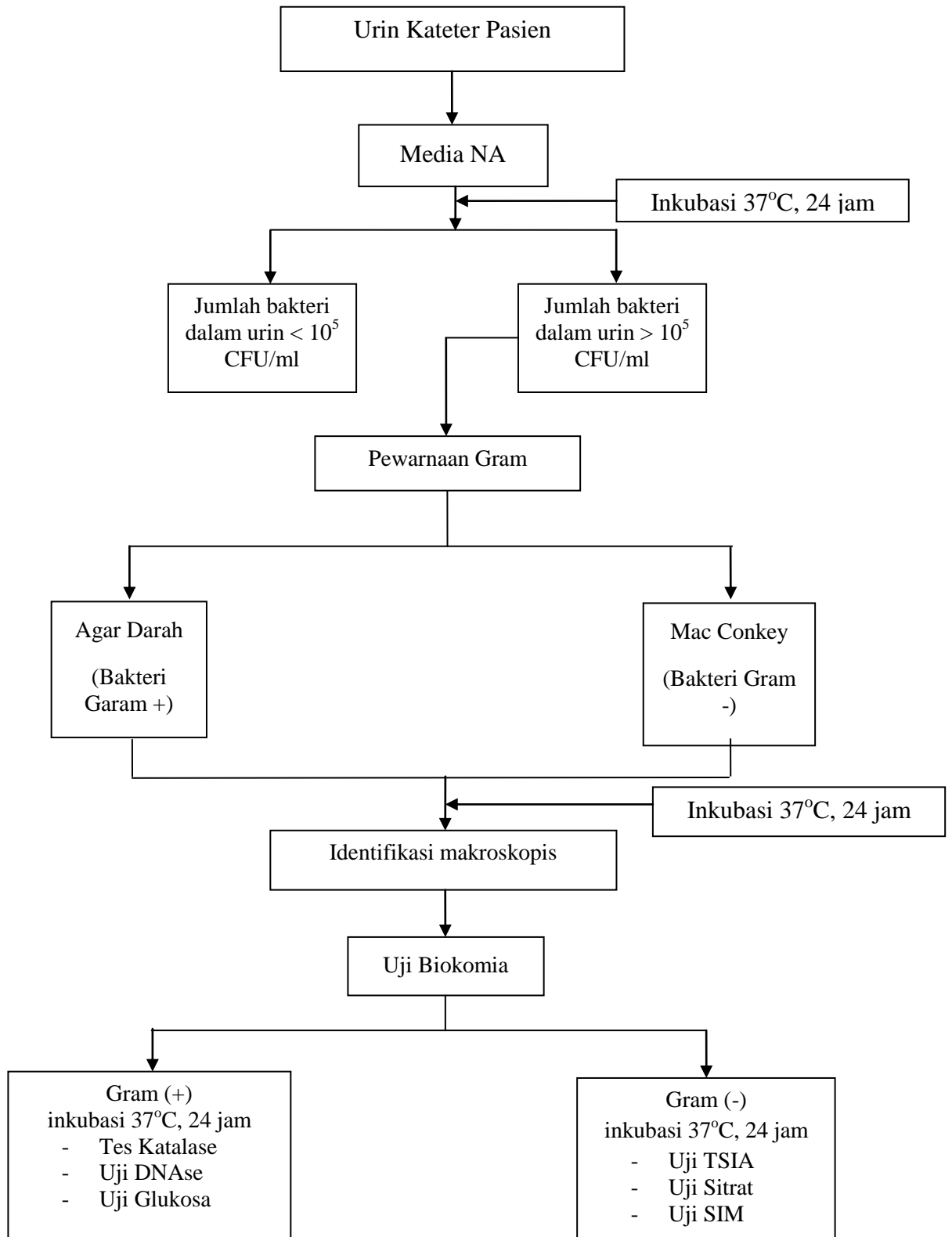
e. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Media TSIA merupakan media diferensial yang digunakan untuk menilai kemampuan bakteri memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hal ini ditandai dengan perubahan warna akibat timbulnya suasana asam, serta terbentuknya H<sub>2</sub>S dan gas. Media diamati pada 2 tempat, yaitu bagian lereng dan bagian dasar. Hasil positif bila media berwarna kuning (A=asam) pada lereng atau dasar media. Sedangkan hasil negatif bila media berwarna merah (K=alkali) pada lereng atau dasar media (Syahrurachman *et al*, 2010).

f. Uji Sitrat

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai sumber utama metabolisme dan pertumbuhan. Hasil positif apabila agar sitrat yang semula berwarna hijau berubah menjadi biru yang timbul akibat suasana asam. Uji ini digunakan untuk membantu diferensiasi *Escherichia coli* dan *Klebsiella* (Harti, 2012).

### 3.6 Alur Penelitian



**Gambar 3.** Alur Penelitian (Ayni, 2009 ; Anonim, 2013)

### 3.7 Definisi Operational

**Table 3.** Definisi Operational

Variabel	Definisi	Cara ukur	Skala
Identifikasi bakteri penyebab ISK pada urin pasien pengguna kateter hari ke 4	Mengetahui jenis bakteri penyebab ISK	Diidentifikasi dengan pewarnaan gram dan tes biokimiawi	Kategorik
Infeksi Saluran Kemih (ISK)	Sejumlah bakteri yang terdapat dalam urin yang jumlahnya >100.000 CFU/ml urim	CFU/ml urin kateter	Kategorik

### 3.8 Etik Penelitian

Penelitian ini telah disetujui dan lolos kaji etik sesuai dengan Surat Keterangan Lolos Kaji Etik nomor : 2128/UM26/8/DT/2014.

### 3.9 Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.