

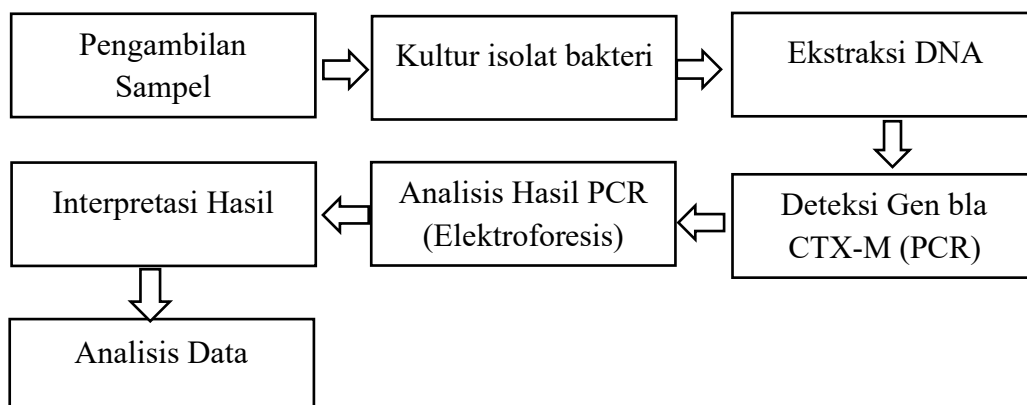
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik dengan pendekatan laboratorium eksperimental (Creswell, 2018). Secara desain, penelitian ini bersifat observasional laboratorium yang bertujuan untuk mendeskripsikan dan menganalisis keberadaan gen *bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae* dari sampel urine pasien isk. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan tahapan yang terstruktur, dimulai dari pengambilan sampel klinis, hingga deteksi gen *bla CTX-M* menggunakan metode PCR. Data yang dihasilkan bersifat kualitatif (ada/tidak adanya gen) dan kuantitatif (sebaran gen), yang kemudian dianalisis secara deskriptif untuk memberikan gambaran molekuler resistensi antibiotik pada populasi pasien ISK di RSUD Wangaya Denpasar. Dengan demikian, penelitian ini tidak melakukan intervensi terhadap subjek, melainkan mengamati dan menganalisis sampel yang telah terkumpul sesuai dengan protokol laboratorium yang telah ditetapkan (Sugianli *et al.*, 2020).

B. Alur Penelitian



Gambar 1 Alur penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan April tahun 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis merupakan satuan tertentu yang dijadikan objek penelitian. Unit analisis pada penelitian ini yaitu isolat *Enterobacteriaceae* yang diisolasi dari sampel urine pasien dengan diagnosis ISK.

2. Sampel penelitian

Sampel urine yang dikumpulkan secara aseptik dari pasien dengan diagnosis klinis ISK yang berobat atau dirawat di RSUD Wangaya, Denpasar.

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode sampling purposif atau purposive sampling. Metode ini dipilih karena penelitian bertujuan untuk menganalisis karakteristik spesifik (gen *bla CTX-M*) pada populasi yang telah terdefinisi dengan jelas, yaitu seluruh isolat bakteri *Enterobacteriaceae* yang memenuhi kriteria inklusi selama periode penelitian. Adapun kriteria pada penelitian ini yaitu:

a. Kriteria Inklusi Sampel Urine

Sampel urine yang dapat dimasukkan dalam penelitian ini harus memenuhi semua kriteria berikut:

1. **Diagnosis Klinis ISK:** Berasal dari pasien dengan diagnosis klinis Infeksi Saluran Kemih (ISK) yang ditetapkan oleh dokter berdasarkan gejala klinis (seperti disuria, urgensi, frekuensi berkemih meningkat, atau nyeri suprapubik) DAN didukung oleh hasil pemeriksaan urinalisis (misalnya, leukosit esterase positif dan/atau nitrit positif).
2. **Kultur Bakteri Positif:** Menunjukkan pertumbuhan bakteri signifikan pada kultur, yaitu $\geq 10^5$ Colony Forming Units per mililiter (CFU/mL) pada media biakan, sesuai dengan standar diagnosis mikrobiologis ISK.
3. **Kesesuaian Waktu:** Diambil selama periode waktu penelitian yang telah ditetapkan (misalnya, Februari – April 2026).
4. **Ketersediaan Data:** Disertai dengan informasi identitas pasien yang lengkap dan dapat dilacak (kode sampel) untuk keperluan dokumentasi.

b. **Kriteria Eksklusi Sampel Urine**

Sampel urine akan dikeluarkan dari penelitian jika memenuhi salah satu kriteria berikut:

1. **Sampel Tidak Memadai:** Volume urine tidak mencukupi untuk melakukan penanaman kultur urine di media MCA
2. **Kontaminasi:** Sampel menunjukkan tanda-tanda kontaminasi selama pengambilan atau transportasi, seperti pertumbuhan lebih dari dua jenis mikroorganisme pada kultur primer yang mengindikasikan kontaminasi flora kulit atau non-patogen.
3. **Patogen Non- *Enterobacteriaceae*:** Bakteri yang tumbuh dominan merupakan patogen di luar famili *Enterobacteriaceae* (misalnya, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, atau *Pseudomonas aeruginosa*).

E. Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian, yaitu, *autoclave*, vortex, *magnetic stirrer*, neraca analitik, mikropipet, gelas ukur, erlenmeyer, oven, Bio Safety Cabinet-level II, rak *microtube*, refrigerated *microcentrifuge*, PCR tube, alat *thermocycler* PCR, UV work station, alat elektroforesis, dan UV-transluminator.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, sampel urin, media *MacConkey Agar*, kit ekstraksi DNA, primer spesifik gen *bla CTX-M*, pewarna DNA, *master mix* PCR, agarosa dan buffer elektroforesis, akuades steril dan *nuclease free water*.

3. Pre analitik

Tahapan pre analitik mencakup seluruh proses sebelum sampel diproses di laboratorium. Langkah ini sangat penting untuk menjaga kualitas sampel agar hasil pemeriksaan tidak bias.

Tahapannya meliputi:

- a. Penerimaan sampel urine: Sampel urin yang datang ke laboratorium dicatat identitasnya meliputi kode pasien, tanggal, dan asal ruangan. Petugas memastikan bahwa sampel berasal dari pasien yang memenuhi kriteria penelitian.
- b. Pemeriksaan kondisi sampel: Sampel diperiksa secara visual untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi, kebocoran, atau volume sampel yang terlalu sedikit untuk dilakukan pemeriksaan.

- c. Penyimpanan sementara: Bila sampel tidak bisa langsung diproses, sampel disimpan pada suhu 2–8° untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan. Penyimpanan tidak boleh lebih dari 24 jam untuk menjaga keakuratan hasil.
- d. Transportasi sampel: Transportasi sampel adalah proses dalam sistem laboratorium kesehatan yang bertujuan untuk mempertahankan integritas sampel biologis seperti darah, urin, atau jaringan selama perjalanan dari lokasi pengambilan ke laboratorium analisis. Proses ini diawali dengan persiapan yang cermat, di mana setiap sampel harus diberi label identitas pasien yang jelas, dimasukkan ke dalam wadah kedap yang sesuai, dan dilengkapi dengan formulir permintaan pemeriksaan. Kondisi transportasi pun harus disesuaikan dengan jenis pemeriksaan sampel untuk analisis rutin dapat dikirim pada suhu ruang dan bisa juga dijaga dalam suhu dingin (2-8°C) menggunakan cooler box berisi ice pack.
- e. Persiapan alat dan media: Semua alat yang akan digunakan (seperti ose, tabung, pipet, media kultur) disiapkan dalam kondisi steril dan sesuai SOP.
- f. Penggunaan teknik aseptik: Semua proses penanganan sampel dilakukan dengan teknik aseptik untuk menghindari kontaminasi yang dapat memengaruhi hasil identifikasi bakteri.

4. Analitik

Tahap analitik merupakan proses inti penelitian karena pada tahap ini seluruh pemeriksaan laboratorium dilakukan untuk memperoleh data yang dibutuhkan. Tahapan ini mencakup proses kultur bakteri, ekstraksi DNA, hingga pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen *bla CTX-M*. Penjelasan setiap tahapan adalah sebagai berikut:

A. Kultur dan Identifikasi Bakteri

Pada tahap ini, sampel urin diinokulasikan ke media *MacConkey Agar* menggunakan teknik aseptik untuk melihat keberadaan bakteri Gram negatif sesuai dengan tahapan berikut:

1. Inokulasi sampel urin pada *MacConkey Agar*.
2. Inkubasi pada suhu 35–37° selama 18–24 jam.
3. Setelah inkubasi, koloni diamati berdasarkan warna, bentuk, dan karakteristik pertumbuhannya.
4. Koloni kemudian diperiksa dengan pewarnaan Gram untuk memastikan bakteri gram negatif berbentuk batang.

B. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA genom murni sebagai template PCR, molekul DNA harus memiliki kualitas baik agar amplifikasi PCR berjalan optimal. untuk tahapannya sebagai berikut:

1. Koloni bakteri dimasukkan ke tabung mikrosentrifuge.
2. Proses ekstraksi dilakukan sesuai prosedur kit yang digunakan (Misalnya PCIA, lisis sel, pemisahan protein, dan pemurnian DNA).
3. DNA yang didapatkan disimpan pada suhu rendah hingga siap digunakan untuk PCR.

C. Amplifikasi Gen *bla CTX-M* Menggunakan PCR

Tahap ini bertujuan mendeteksi ada atau tidaknya gen *bla CTX-M* pada DNA isolat positif. Tahapan pengujiannya sebagai berikut:

1. PCR mix disiapkan yang terdiri dari *master mix*, primer spesifik *bla CTX-M*, template DNA, *nuclease free water*, primer *forward* dan primer *reverse*. Primer yang digunakan mengacu pada primer standar yang telah digunakan dalam

penelitian Rahman *et al.*, dengan sekuen sebagai berikut:

Primer forward *bla CTX-M*: 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3'

Primer reverse *bla CTX-M*: 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'

Pasangan primer ini mengamplifikasi fragmen gen *bla CTX-M* dengan ukuran sekitar 560–593 bp (Rahman *et al.*, 2010; Kurniawan *et al.*, 2023).

2. Tabung PCR dimasukkan ke dalam *thermal cycler* untuk melalui siklus PCR (denaturasi, annealing, dan ekstensi).
3. Setelah PCR selesai, hasil produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa.
4. Gel diamati pada UV transilluminator.
 - a. Positif gen *bla CTX-M*: terlihat pita DNA pada ukuran target (yang berukuran sekitar 560–593 bp).
 - b. Negatif gen *bla CTX-M*: pita target tidak terlihat.

5. Post analitik

Tahapan post analitik mencakup proses setelah pemeriksaan laboratorium selesai dilakukan. Tahap ini berfungsi untuk memastikan hasil yang diperoleh dapat dibaca, dicatat, dan dianalisis secara benar. Langkah-langkahnya meliputi:

- a. Pencatatan hasil: Semua hasil pemeriksaan dari proses kultur, ekstraksi dan PCR dicatat ke dalam lembar hasil atau database laboratorium. Dokumentasi biasanya disertai foto hasil PCR.
- b. Verifikasi data: Hasil yang telah dicatat diperiksa kembali untuk memastikan tidak ada kesalahan pencatatan atau interpretasi. Bila ditemukan hasil yang meragukan, pemeriksaan dapat diulang sesuai kebutuhan.

- c. Pengolahan data: Data yang sudah tervalidasi kemudian disusun dalam bentuk tabel atau rekapitulasi untuk mempermudah proses analisis. Pada tahap ini, isolat diklasifikasikan menjadi -positif/negatif dan *bla CTX-M* positif/negatif.
- d. Penyajian hasil: Hasil penelitian disusun dalam bentuk persentase atau distribusi frekuensi untuk menggambarkan pola resistensi dan keberadaan gen *bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae*.
- e. Penyimpanan dan dokumentasi: Semua dokumen dan hasil pemeriksaan disimpan sebagai arsip penelitian. Sampel DNA atau isolat bakteri yang masih diperlukan dapat disimpan kembali sesuai kebutuhan laboratorium.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang di kumpulkan

- a. Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer dan data sekunder. Data primer yaitu data yang diperoleh langsung dari hasil pemeriksaan laboratorium. Data tersebut meliputi:

- 1. Hasil kultur bakteri dari sampel urin untuk mengidentifikasi *Enterobacteriaceae*
- 2. Hasil pemeriksaan molekuler berupa keberadaan atau ketiadaan gen *bla CTX-M* melalui teknik PCR.

Data ini merupakan hasil observasi dan analisis langsung dari isolat bakteri yang menjadi objek penelitian.

- b. Data sekunder merupakan data yang tidak diperoleh secara langsung dari proses pemeriksaan laboratorium, melainkan berasal dari sumber yang telah tersedia. Dalam penelitian ini, data sekunder berupa literatur ilmiah, jurnal penelitian,

dan referensi terkait yang digunakan sebagai bahan pendukung untuk memperkuat analisis dan pembahasan hasil penelitian

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui serangkaian pemeriksaan laboratorium yang mengikuti prosedur standar operasional (SOP) pada setiap tahap.

Teknik pengumpulan data mencakup:

- a. Melakukan kultur sampel urin pada media selektif untuk memperoleh isolat bakteri.
- b. Melakukan ekstraksi DNA, amplifikasi gen melalui PCR, serta analisis elektroforesis untuk mendeteksi gen *bla CTX-M*.

Setiap hasil pemeriksaan dicatat secara sistematis pada lembar kerja laboratorium untuk memastikan data yang terkumpul akurat dan dapat ditelusuri.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan untuk mengumpulkan data meliputi:

- a. Lembar kerja laboratorium, digunakan untuk mencatat hasil pemeriksaan kultur, hasil elektroforesis ekstraksi DNA dan PCR.
- b. Buku pencatatan hasil (*logbook*), digunakan untuk merekam setiap langkah pemeriksaan dan memastikan keterlacakan data.
- c. Dokumentasi foto, seperti foto hasil elektroforesis PCR yang berfungsi sebagai bukti visual hasil penelitian.

Instrumen ini membantu memastikan bahwa seluruh data tersimpan dengan baik dan dapat diverifikasi.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Setelah semua data terkumpul, dilakukan proses pengolahan melalui tahapan berikut:

- a. Pencatatan: Seluruh hasil pemeriksaan dimasukkan ke dalam tabel rekapitulasi.
- b. Verifikasi: Data dicek ulang untuk memastikan tidak ada kesalahan pencatatan atau interpretasi.
- c. Klasifikasi: Isolat dikelompokkan berdasarkan hasil PCR (positif atau negatif).
- d. Penyajian: Data kemudian disusun dalam bentuk tabel, diagram, atau distribusi frekuensi agar lebih mudah dianalisis.

Proses ini bertujuan memastikan bahwa data yang dianalisis telah valid dan siap untuk ditafsirkan.

2. Analisis data

Analisis data dilakukan secara deskriptif, yaitu dengan menghitung jumlah dan persentase isolat *Enterobacteriaceae* yang menunjukkan:

- a. Positif atau negatif pada kultur urine di media MCA.
- b. Positif atau negatif terhadap gen *bla CTX-M* berdasarkan pemeriksaan PCR.

Hasil analisis deskriptif ini memberikan gambaran mengenai seberapa besar sebaran gen *bla CTX-M* pada isolat *Enterobacteriaceae*.