

III. MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Universitas Wijaya Kusuma Surabaya selama bulan Mei-Juli tahun 2023. Pengambilan sampel swab anus *stray cat* dilakukan di Kota Surabaya bagian timur.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Gloves, tabung reaksi, *cotton swab sterile*, kapas, kertas label, alat tulis, karet gelang, plastik es, *cool box*, *ice gel*, inkubator, vortex, bunsen, korek api, *object glass*, penjepit kayu, rak pewarnaan, mikroskop, rak tabung reaksi, ose bulat, ose runcing, tisu, autoklaf, kulkas, pinset, cawan petri, *erlenmeyer* 250 ml, kompor listrik, serbet, timbangan, gunting, panci, aluminium foil, spuit dan jangka sorong.

3.2.2 Bahan Penelitian

Media *Buffered Pepton Water* (BPW) sebagai media *enrichment*, media pertumbuhan bakteri MCA (HIMEDIA MH081®). Bahan pewarnaan Gram yaitu kristal violet 2%, lugol, alkohol 96%, safranin 0,2%, *oil emersi*, NaCl fisiologi. Media uji biokimia TSIA (HIMEDIA M021®), SCA (HIMEDIA M099®), Urease (HIMEDIA M112®), SIM (HIMEDIA M181®), MR-VP (HIMEDIA M070®). Reagent uji biokimia *kovach*, larutan KOH 40%, larutan *a-naphtol* 5%, larutan *methyl red* 1%. Media Uji Resistensi MHA (HIMEDIA M173®), aquades

steril, *McFarland* 0.5, antibiotik tetrasiklin 30 µg (OXOID®) dan streptomisin 10 µg (OXOID®).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang dilakukan di laboratorium dengan menggunakan sampel swab anus *stray cat*. Menurut Ramdhan, penelitian deskriptif merupakan penelitian yang dilakukan dengan menggambarkan suatu hasil dari penelitian dengan tujuan untuk memberikan deskripsi dan memaparkan validasi data berdasarkan fakta dari hasil penelitian (Ramdhan, 2021).

3.3.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Kota Surabaya Timur. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan media *enrichment* BPW berjumlah 42 sampel. Pedoman penentuan jumlah sampel adalah sebaiknya berjumlah kisaran 30 s/d 500 sampel, sehingga penelitian ini sudah sesuai dan dapat mewakili populasi dari sampel penelitian (Sugiyono, 2011).

Tabel 3.1 Distribusi Pengambilan Sampel

No	Tempat	Jumlah Sampel
1	Kec. Rungkut	10
2	Kec. Mulyorejo	10
3	Kec. Gunung Anyar	10
4	Kec. Sukolilo	8
5	Kec. Gubeng	4
Total		42

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *Simple Random Sample* dimana setiap unit memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih. Pengambilan sampel swab anus *stray cat* mengabaikan jenis kelamin, usia dan status kesehatan kucing. Sampel yang digunakan mewakili beberapa tempat seperti *stray cat* yang ada di pasar hingga lingkungan sekitar pemukiman warga di beberapa kecamatan Surabaya timur. Adapun alasan untuk menggunakan pengambilan sampel dengan teknik *Simple Random Sample* adalah terbatasnya pengetahuan terkait total populasi *stray cat* secara pasti, sehingga teknik ini menjadi salah satu cara yang paling efisien yang dapat mewakili populasi *stray cat*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian dan Pembuatan Media

Peralatan yang digunakan untuk penelitian akan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan alkohol dan autoklaf sebelum melakukan penelitian. Prinsip aseptik selama pengujian di laboratorium sangat penting untuk dilakukan, sehingga sebelum memulai pengujian meja penelitian akan disemprot dengan alkohol agar meminimalisir kontaminasi. Setiap orang yang terlibat di dalam laboratorium mengutamakan keselamatan dan keamanan kerja, seperti tetap menggunakan jas lab, masker dan *gloves* (Susanti *et al.*, 2021).

Pembuatan media BPW, MCA, media uji biokimia dan media MHA sebagai media uji resistensi pada dasarnya memiliki mekanisme pembuatan yang cukup sama. Bahan baku pembuatan media ditimbang sesuai takaran yang tertera

di dalam kemasan lalu ditambahkan larutan aquades steril sebanyak 1.000 ml kemudian homogenkan di dalam *erlenmeyer*, setelah itu lakukan pemanasan dengan merebus media hingga benar-benar larut. Sterilisasi media sesuai petunjuk dalam kemasan bahan baku yaitu dengan autoklaf 121°C selama 30 menit. Penuangan media ke dalam cawan petri steril dilakukan di dekat api bunsen agar meminimalisir kontaminasi (Suprpti *et al.*, 2020). Setelah dingin atau padat media kemudian di inkubasi selama 18-24 jam. Media disimpan di dalam kulkas steril.

3.4.2 Preparasi Sampel

Stray cat dilakukan swab pada bagian anus menggunakan *cotton swab sterile* kemudian dimasukkan ke dalam media BPW. Sampel kemudian dibawa menggunakan *cool box* menuju laboratorium lalu dihomogenkan menggunakan vortex.

3.4.3 Isolasi Bakteri *Escherichia coli*

Isolasi bakteri dari swab anus *stray cat* akan ditumbuhkan pada media MCA. Penggoresan menggunakan ose bulat steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Yaddi *et al.*, 2020). Pemurnian dilakukan sebanyak 2-3 kali. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ditandai dengan koloni berwarna merah muda yang menandakan kemampuan bakteri *Escherichia coli* memfermentasi laktosa (Khoiriyah *et al.*, 2022).

3.4.4 Pemeriksaan Mikroskop

Koloni bakteri dan akuades dihomogenkan membentuk lingkaran dari dalam ke luar. Preparat kemudian difiksasi di atas api bunsen lalu diwarnai dengan kristal violet selama kurang lebih satu menit lalu cuci dengan air mengalir, setelah itu tambahkan lugol dan diamkan selama satu menit lalu cuci preparat dengan air. Tambahkan alkohol 96% diamkan selama 15-30 detik dan cuci dengan air mengalir kemudian beri pewarna safranin selama satu menit lalu cuci dan keringkan menggunakan kertas saring atau tisu (Sapitri dan Afrinasari, 2019). Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan pembesaran 1000× pada preparat pewarnaan yang telah ditetesi *oil emersi* (Ummamie *et al.*, 2017).

3.4.5 Uji Biokimia

3.4.5.1 *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Uji TSIA digunakan untuk mengetahui adanya fermentasi beberapa jenis gula yaitu glukosa, laktosa dan sukrosa menjadi asam dengan membentuk gas atau bahkan tanpa membentuk gas. Uji TSIA dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasikan secara aseptik pada media TSIA, lalu diinkubasi selama 37°C selama 18-24 (Aulia *et al.*, 2015). Koloni bakteri pada media MCA diambil menggunakan ose runcing. Inokulasi dilakukan dengan cara menusuk permukaan *butt* media TSIA dan menggoreskan membentuk zig-zag pada bagian *slant* (Markey *et al.*, 2013).

Indikator yang dipakai dalam pengujian TSIA adalah *phenol red* sehingga munculnya warna merah pada media mengindikasikan reaksi basa sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam (Maisarah, 2022). Pengujian TSIA dilakukan

pada media tabung dengan bagian *slant* atau miring menggambarkan fermentasi terhadap laktosa dan sukrosa, sedangkan bagian *butt* atau dasar tabung mencerminkan fermentasi terhadap glukosa. Terdapat gas dicirikan dengan pembentukan rongga disekitar media dan H₂S yang terbentuk akan memunculkan warna hitam pada bagian *butt* atau *slant* (Sari *et al.*, 2019).

3.4.5.2 Simmons Citrate Agar (SCA)

Isolat dikultur pada bagian miring media SCA secara zig-zag menggunakan ose runcing kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH sehingga bersifat basa dan mengubah warna media biakan dari hijau menjadi biru hal ini menandakan uji bernilai positif. Apabila bakteri tidak dapat merubah warna media bakteri bernilai negatif yang berarti bakteri tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya (Sapitri dan Afrinasari, 2019).

3.4.5.3 Uji Urease

Uji urease dilakukan untuk melihat penguraian urea menjadi amonia. Bakteri yang memiliki enzim urease dapat menguraikan urea membentuk amonia. Koloni diinokulasikan pada media uji urease, kemudian diinkubasi secara zig-zag pada suhu 37°C selama 24 jam (Iswara, 2015). Hasil positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna media menjadi merah jambu hasil negatif bila tidak terjadi perubahan warna pada media (Maisarah, 2022).

3.4.5.4 Sulfide Indol Motility (SIM)

Media SIM digunakan untuk uji Indol dengan penambahan reagen *kovach*. Uji Indol merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui adanya enzim

triptofanase pada bakteri tersebut sehingga dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat. Asam amino triptofan merupakan asam amino yang digunakan sebagai sumber energi oleh mikroorganisme (Antriana, 2014). Uji ini dilakukan dengan memindahkan biakan bakteri menggunakan ose runcing pada media SIM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian ditambah reagen 1-2 tetes *Kovach* (Fallo dan Sine, 2016). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah ungu, untuk bakteri *Escherichia coli* uji indol adalah positif (Rahayu dan Gumilar, 2017).

3.4.5.5 Methyl Red (MR)

Uji MR digunakan untuk mendeteksi adanya asam sebagai produk akhir dari hasil oksidasi glukosa. Cara melakukan uji MR yaitu dengan memindahkan biakan bakteri ke larutan fosfat, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu ditambahkan 3-4 tetes reagen MR yaitu *methyl red* 1%. Pengujian dilakukan pada media pepton glukosa phosphat dan tetap menerapkan prinsip aseptik (Fallo dan Sine, 2016).

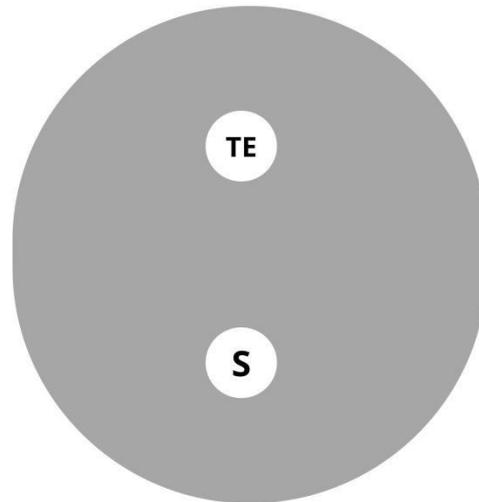
3.4.5.6 Voges Proskauer (VP)

Uji VP dilakukan dengan tujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam mengubah glukosa menjadi alkohol atau asam organik. Uji VP dilakukan pada media yang sama dengan uji MR yaitu pepton glukosa phosphate dengan cara bakteri diinokulasi pada media, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu tambahkan dua tetes reagen KOH 40% dan tiga tetes α -naphthol 5% diamkan homogenkan lalu dimakan selama beberapa menit (Sari *et al.*, 2019).

3.4.6 Uji Resistensi Antibiotik

Pengujian resistensi antibiotik menggunakan metode *Disk Diffusion Kirby-Bauer* yang mengacu pada *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* tahun 2022. *Mueller Hinton Agar (MHA)* merupakan media uji kepekaan yang biasa digunakan dalam prosedur Standar Internasional pengujian resistensi (Suprapti *et al.*, 2020). Antibiotik yang digunakan untuk pengujian adalah tetrasiklin 30 µg dan streptomisin 10 µg. Suspensi bakteri yang digunakan untuk pengujian resistensi dibuat dengan mengambil koloni bakteri sebanyak lima koloni kemudian larutkan NaCl Fisiologi dan bandingkan kekeruhannya dengan Standar *MacFarland* 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, jika kekeruhannya sudah sesuai dengan larutan pada tabung *McFarland* maka suspensi siap digunakan untuk pengujian (Yaddi *et al.*, 2020).

Suspensi bakteri ditebar pada media MHA lalu tunggu sampai kering. Kertas berbentuk cakram atau disk antibiotik yang telah mengandung antibiotik tetrasiklin 30 µg dan streptomisin 10 µg diletakan pada lempengan media MHA kemudian inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Mustika *et al.*, 2015). Pembacaan hasil diukur menggunakan jangka sorong atau penggaris dan merujuk pada zona hambat antibiotik (tabel 2.1).



Gambar 3.1 Peletakan disk antibiotik (TE= Tetrasiklin dan S= Streptomisin)

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode deskriptif kualitatif dengan memaparkan hasil dari isolasi dan identifikasi resistensi antibiotik tetrasiklin dan streptomisin terhadap infeksi bakteri *Escherichia coli* pada swab anus *stray cat* di Kota Surabaya timur.

3.6 Kerangka Penelitian

