

Pour Plate dan Spread Plate Sebagai Metode yang Akurat dalam Pemeriksaan Jumlah Bakteri dalam Urin pada Suhu Ruang dan Suhu Kulkas

Zahratin Nisa' A'yunin

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya, Surabaya, Indonesia; zahratinnisaay946@gmail.com
(koresponden)

Pestariati

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya, Surabaya, Indonesia; pestariati@poltekkesdepkes-sby.ac.id

Lully Hanni Endarini

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya, Surabaya, Indonesia; lullyhanniendarini@gmail.com

Dwi Krihariyani

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya, Surabaya, Indonesia; dwikrihariyani@gmail.com

ABSTRACT

Laboratory diagnosis in identifying infections, such as those in the urinary tract, is based on urine culture as the gold standard, requiring a bacterial colony count of more than 10^5 CFU/mL. Bacterial counts can be calculated using the pour plate method, which requires high precision but carries a higher risk of contamination; or the spread plate method, which carries a lower risk of contamination but is easier to calculate. The purpose of this study was to compare the results of observations of the number of bacteria in urine stored at room temperature and in a refrigerator using the pour plate and spread plate methods. This research method was a comparative laboratory study in order to compare the results of observations of total bacteria in urine stored at room temperature and in a refrigerator using the pour plate and spread plate techniques. The results were analyzed descriptively and then compared using the Friedman test and the Mann Whitney U test. The results showed a significant difference in the results of bacterial counts between immediate examination and with a two-hour waiting time at both refrigerator and room temperature using two culture techniques, namely the total plate count method, namely the spread plate and pour plate. Both techniques met accuracy requirements, but the spread plate method had a higher accuracy for bacterial counts than the pour plate method, based on the d value obtained. It was further concluded that pour plate and spread plate are accurate methods for examining the bacterial count in urine at room temperature and refrigerator temperature.

Keywords: Urine; room temperature; refrigerator temperature; spread plate; pour plate

ABSTRAK

Penegakan diagnosis laboratorium dalam mengidentifikasi adanya infeksi, seperti pada saluran kemih adalah kultur urine sebagai gold standar yang memerlukan *colony counting* bakteri lebih dari sama dengan 10^5 CFU/mL. Penghitungan jumlah bakteri bisa dilakukan dengan metode *pour plate* yang membutuhkan ketelitian cukup tinggi namun memiliki risiko kontaminasi lebih tinggi; atau dengan metode *spread plate* yang memiliki risiko kontaminasi lebih rendah namun lebih mudah dihitung. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan hasil pengamatan jumlah bakteri urin yang disimpan pada suhu ruang dan di kulkas dengan metode *pour plate* dan *spread plate*. Metode penelitian ini adalah studi komparatif laboratoris dalam rangka membandingkan hasil pengamatan total bakteri dalam urin yang diletakkan pada suhu ruang dan kulkas dengan teknik *pour plate* dan *spread plate*. Hasil pemeriksaan dianalisis secara deskriptif lalu dibandingkan dengan uji Friedman dan uji Mann Whitney U. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil perhitungan jumlah bakteri antara pemeriksaan segera dan dengan waktu tunggu selama dua jam pada suhu kulkas maupun suhu ruang menggunakan dua teknik kultur metode *total plate count*, yaitu *spread plate* maupun *pour plate*. Kedua teknik tersebut memenuhi syarat akurasi, namun metode *spread plate* memiliki akurasi yang lebih tinggi untuk perhitungan jumlah bakteri daripada metode *pour plate*, berdasarkan nilai d yang didapatkan. Selanjutnya disimpulkan bahwa *pour plate* dan *spread plate* merupakan metode yang akurat dalam pemeriksaan jumlah bakteri dalam urin pada suhu ruang dan suhu kulkas.

Kata kunci: Urin; suhu ruang; suhu kulkas; *spread plate*; *pour plate*

PENDAHULUAN

Laboratorium berperan penting dalam penegakan diagnosis untuk mengidentifikasi suatu penyakit atau infeksi, misalnya infeksi yang disebabkan oleh bakteri pada kondisi infeksi saluran kemih. Hal ini memerlukan pemeriksaan dengan menggunakan sampel urin dengan sensitivitas tinggi sebagai media pertumbuhan bagi bakteri karena zat-zat organik dan anorganik yang terkandung di dalamnya dapat menjadi sumber nutrisi bagi bakteri.^(1,2)

Proses pemeriksaan dalam memastikan adanya infeksi pada saluran kemih adalah kultur urin sebagai *gold standar* yang memerlukan *colony counting* bakteri lebih dari sama dengan 10^5 CFU/mL.⁽³⁾ Perhitungan jumlah bakteri dapat dilakukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC), yang kemudian dibedakan atas dua cara yakni metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan atau tabur (*spread plate*). Metode *pour plate* membutuhkan ketelitian yang cukup tinggi dalam hal mengamati jumlah bakteri dikarenakan metode ini memiliki resiko kontaminasi lebih tinggi dan penyebaran bakteri yang cukup banyak.⁽⁴⁾ Metode *spread plate* memiliki resiko kontaminasi lebih rendah dan lebih mudah dihitung, tetapi membutuhkan teknik khusus pada saat penyebaran sampel di media agar.⁽⁵⁾ Hal ini dimungkinkan dapat terjadi perbedaan perhitungan jumlah bakteri yang signifikan.

Keterbatasan pelayanan di laboratorium antara lain sumber daya manusia yang kurang, pergantian *shift* petugas yang membutuhkan cukup waktu dan layanan pemeriksaan *on-site* yang menyebabkan terjadi penundaan pemeriksaan dan sampel urin sebagian akan disimpan pada kulkas untuk menjaga kualitas urin. Berdasarkan *Standard Operating Procedure* (SOP) pemeriksaan laboratorium klinik menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI

No. 43 tahun 2013, spesimen urine harus sudah sampai di laboratorium dan diproses dalam waktu maksimal 1 sampai 2 jam setelah pengambilan pada suhu ruang, namun jika hal ini tidak mungkin, spesimen harus disimpan pada suhu (2-8°C) setelah pengambilan.⁽⁶⁾

Berdasarkan uraian masalah di atas, maka diperlukan penelitian yang bertujuan untuk membandingkan hasil pengamatan jumlah bakteri urin yang disimpan pada suhu ruang dan di kulkas dengan metode *pour plate* dan *spread plate*.

METODE

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik menggunakan pendekatan *cross-sectional* dengan mengumpulkan data penelitian yang diamati dalam satu waktu.⁽⁷⁾ Memberikan waktu penundaan pemeriksaan sampel urine selama 2 jam pada suhu yang berbeda di suhu ruang dan di kulkas serta menggunakan teknik kultur *pour plate* dan *spread plate* kemudian membandingkan hasil tersebut dengan pemeriksaan segera 0 jam sebagai *Gold Standard*. Pengambilan sampel dilakukan dengan pengecekan data dan pengambilan langsung pada populasi dengan cara *purposive sampling* dengan kriteria inklusi pada sampel adalah pengambilan urin berasal dari populasi yang ditentukan dan pengambilan urine porsi tengah (*midstream*) oleh penderita yang sebelumnya telah diberikan penjelasan dan disarankan untuk pengambilan pada pagi hari (tidak buang air kecil atau besar pada jam 22.00 hingga bangun tidur).

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah 25 urin dengan indikasi *bacteriuria* sesuai populasi dan inklusi yang telah ditentukan. Peneliti memosisikan sampel urin berada di dalam *container* steril dan tertutup rapat untuk menghindari terjadinya kebocoran, lalu meletakkan *container* dalam kotak *stearofoam* (*coolbox*) untuk mencegah kontaminasi pada sampel selama di perjalanan.

Pengujian sampel urin dilakukan berdasarkan uji *Total Plate Count* (TPC) dengan menggunakan dua teknik kultur yaitu teknik *spread plate* dan *pour plate*. Teknik *spread plate* dilakukan dengan menginokulasi hasil pengenceran sampel sebanyak 100 µl sampel pada ±20 ml media *Nutrient Agar Plate* yang telah dituangkan pada cawan petri. Setelah itu diratakan dengan menggunakan *hockey stick* dan diinkubasi selama 24 jam. Teknik *pour plate* dilakukan dengan mengambil hasil pengenceran sampel sebanyak 1 ml sampel dan dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dituangkan ±20 ml media *Nutrient Agar Plate* pada cawan petri tersebut. Lalu media diratakan dengan menggoyangkan petri membentuk seperti angka delapan dan diinkubasi selama 24 jam.

Langkah kerja perhitungan koloni bakteri sebagai berikut:

- 1) Jumlah koloni bakteri dari sampel dihitung dengan menggunakan rumus: (jumlah koloni percawan) x (1 per faktor pengenceran).
- 2) Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang masing-masing memiliki adalah 30-300 CFU (*Colony Forming Unit*), apabila lebih dari itu dikategorikan TUBD (terlalu banyak untuk dihitung) atau *too numeous to count* (TNTC).
- 3) Koloni besar, kecil, menjalar yang terikat sebagai satu garis dianggap berasal dari 1 bakteri.
- 4) Koloni yang tumbuh menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri, tidak disebut sebagai koloni melainkan *spreader*
- 5) Perhitungan dapat dilakukan dengan menggunakan *colony counter*.

Perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dilakukan menggunakan hitungan metode uji TPC, dilakukan pada pengenceran dengan jumlah koloni yang bisa diamati yaitu 30-300. Hal ini dilakukan untuk mengurangi kemungkinan kesalahan pada perhitungan.

Hasil pemeriksaan selanjutnya ditabulasi sesuai dengan *Standard Plate Count* (SPC) untuk mempermudah pembacaan hasil. Data kemudian dianalisis menggunakan uji Friedman dan uji Mann Whitney U untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan metode.

HASIL

Pengamatan hasil perhitungan koloni bakteri dari sampel yang dilakukan pengamatan segera (0 jam) kemudian dibagi menjadi 2 perlakuan penundaan selama 2 jam pada suhu kulkas (9°C) dan suhu ruang (30°C) dengan teknik kultur *spread plate* dan *pour plate*. Data jumlah hasil perhitungan koloni bakteri sampel segera diperiksa digunakan sebagai *Gold standart* dengan analisis rerata dari 25 sampel sebesar $5,84 \times 10^4$ CFU/mL menggunakan teknik *spread plate* dan $1,87 \times 10^5$ CFU/mL dengan teknik *pour plate*. Pada penundaan selama 2 jam di suhu kulkas (9°C) dan suhu ruang (30°C) terlihat bahwa pertumbuhan jumlah koloni bakteri mengalami peningkatan spesifik yang bervariasi baik pada metode *spread plate* dan *pour plate* (Tabel 1).

Hasil analisis data menggunakan uji Friedman diperoleh hasil $p = 0,000$ yang artinya pada kelompok perlakuan segera, penundaan 2 jam pada suhu kulkas dan suhu ruang terdapat perbedaan. Data dilanjutkan ke uji Mann-Whitney U untuk melihat perbedaan dari penggunaan metode *Spread Plate* dan metode *Pour Plate*, dengan $p = 0,000$ yang artinya pada kedua metode tersebut, jumlah bakteri pada kedua metode terdapat perbedaan. Data hasil penelitian kemudian dilanjutkan untuk melihat akurasi dari masing-masing metode yang digunakan. Akurasi dapat ditentukan melalui selisih bagi dari pengukuran standart deviasi dengan pengukuran rerata masing-masing metode.

Hasil pengukuran akurasi data penelitian kedua metode memenuhi syarat akurasi ($d < \alpha = 2$), maka dari kedua metode teknik kultur tersebut masing-masing dapat digunakan dalam perhitungan jumlah koloni, dengan perbedaan tidak terlalu signifikan yang terlihat bahwa metode *pour plate* memiliki akurasi lebih tinggi daripada metode *spread plate*, hal itu karena semakin kecil nilai d maka semakin tinggi akurasi (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil perhitungan jumlah koloni sampel penelitian berdasarkan rumus perhitungan dengan perlakuan pada media *Nutrient Agar*

No	Kode sampel	Segera (0 jam)		Suhu kulkas (2 jam)		Suhu ruang (2 jam)	
		<i>Spread Plate</i>	<i>Pour Plate</i>	<i>Spread Plate</i>	<i>Pour Plate</i>	<i>Spread Plate</i>	<i>Pour Plate</i>
1.	K1	4 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵	7,5 x10 ⁴	2,9 x10 ⁵	9,7x10 ⁴	2,9x10 ⁵
2.	K2	3,5 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵	3,8 x10 ⁴	2,6 x10 ⁵	5 x10 ⁴	2,9x10 ⁵
3.	K3	5 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵	7,4 x10 ⁴	2,7 x10 ⁵	1x10 ⁵	2,8x10 ⁵
4.	K4	3 x10 ⁴	1,4 x10 ⁵	3,7 x10 ⁴	2,7 x10 ⁵	7,1x10 ⁴	2,9x10 ⁵
5.	K5	3,5 x10 ⁴	1,7 x10 ⁵	4 x10 ⁴	2,3 x10 ⁵	4,9x10 ⁴	2,8x10 ⁵
6.	K6	3,8 x10 ⁴	2,2 x10 ⁵	6,6 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵	1,3x10 ⁵	TUBD
7.	K7	5 x10 ⁴	2,3 x10 ⁵	6,4 x10 ⁴	3 x10 ⁵	7 x10 ⁴	TUBD
8.	K8	4,9 x10 ⁴	2,7 x10 ⁵	5,5 x10 ⁴	2,8 x10 ⁵	6,7x10 ⁴	2,9x10 ⁵
9.	K9	6,6 x10 ⁴	2,6 x10 ⁵	7,8 x10 ⁴	2,9 x10 ⁵	8,7x10 ⁴	3x10 ⁵
10.	K10	4,9 x10 ⁴	2,1 x10 ⁵	6,4 x10 ⁴	2,9 x10 ⁵	5,2x10 ⁴	2,9x10 ⁵
11.	K11	7,9 x10 ⁴	1,5 x10 ⁵	8,1 x10 ⁴	2,8 x10 ⁵	2,2x10 ⁵	TUBD
12.	K12	9,3 x10 ⁴	1,8 x10 ⁵	1 x10 ⁵	2,2 x10 ⁵	2,2x10 ⁵	TUBD
13.	K13	7,8 x10 ⁴	1,3 x10 ⁵	9,4 x10 ⁴	2,8 x10 ⁵	2,6x10 ⁵	TUBD
14.	K14	6,1 x10 ⁴	1,6 x10 ⁵	8,9 x10 ⁴	2,9 x10 ⁵	2,2x10 ⁵	TUBD
15.	K15	7,4 x10 ⁴	1,6 x10 ⁵	8,3 x10 ⁴	2,5 x10 ⁵	1,9x10 ⁵	TUBD
16.	K16	6,6 x10 ⁴	1,7 x10 ⁵	7,2 x10 ⁴	2,6 x10 ⁵	1 x10 ⁵	TUBD
17.	K17	3,7 x10 ⁴	1,4 x10 ⁵	5,9 x10 ⁴	1,8 x10 ⁵	7,2x10 ⁴	2,5x10 ⁵
18.	K18	7,2 x10 ⁴	1,2 x10 ⁵	1,1 x10 ⁵	2,7 x10 ⁵	7,2x10 ⁴	TUBD
19.	K19	3,7 x10 ⁴	1,1 x10 ⁵	5,3 x10 ⁴	1,3 x10 ⁵	6,1x10 ⁴	1,4x10 ⁵
20.	K20	3,8 x10 ⁴	1,8 x10 ⁵	7,3 x10 ⁴	2,6 x10 ⁵	9,4x10 ⁴	2,8x10 ⁵
21.	K21	6,8 x10 ⁴	2,1 x10 ⁵	8,5 x10 ⁴	2,8 x10 ⁵	9,5x10 ⁴	TUBD
22.	K22	9 x10 ⁴	1,9 x10 ⁵	9,8 x10 ⁴	2,9 x10 ⁵	1,9x10 ⁵	2,9x10 ⁵
23.	K23	5,7 x10 ⁴	1,8 x10 ⁵	9,5 x10 ⁴	2,1 x10 ⁵	2,4x10 ⁵	2,9x10 ⁵
24.	K24	9,8 x10 ⁴	1,6 x10 ⁵	1,9 x10 ⁵	2,8 x10 ⁵	1,5x10 ⁵	TUBD
25.	K25	7 x10 ⁴	1,9 x10 ⁵	9,1 x10 ⁴	2,4 x10 ⁵	1,3x10 ⁵	2,7x10 ⁵

Tabel 2. Hasil perhitungan akurasi metode *pour plate* dan *spread plate*

Variabel	Hasil perhitungan metode					
	Rerata		Simpangan baku		d	
	<i>Spread</i>	<i>Pour</i>	<i>Spread</i>	<i>Pour</i>	<i>Spread</i>	<i>Pour</i>
Segera diperiksa	58,40	187,9	20,060	46,452	0,343	0,247
Penundaan 2 jam pada suhu kulkas	78,52	257,1	30,607	39,521	0,389	0,153
Penundaan 2 jam pada suhu ruang	123,52	299,1	66,826	41,412	0,541	0,138

PEMBAHASAN

Penundaan pemeriksaan urin pada pengamatan jumlah bakteri dapat menyebabkan hasil yang tidak sebenarnya atau meningkat palsu.⁽⁸⁻¹¹⁾ Ini dilihat dari interval waktu regenerasi bakteri yaitu 15 menit sampai dengan 20 menit ditambah dengan suhu optimum pertumbuhan bakteri pada urin adalah 25-37°C bila urin yang terindikasi bakteriuria dibiarkan saja pada suhu ruang. Metabolisme bakteri yang terjadi pada suhu ruang berada di fase logaritmik atau fase eksponensial yang merupakan fase bakteri untuk tumbuh dan membelah diri secara maksimal dengan menghasilkan metabolit sekunder yang disimpan secara ekstraseluler. Ini membuat membran bakteri lebih *fluid* dan fleksibel serta mempertahankan permeabilitas selektifnya didukung dengan terjadinya peningkatan enzim metabolik yang dapat mengoptimalkan replikasi bakteri di urin, sehingga metabolisme akan berjalan lebih cepat dan terjadi pertumbuhan bakteri lebih banyak daripada pemeriksaan segera.⁽¹²⁻¹⁵⁾

Ketika urin dengan indikasi bakteriuria disimpan pada suhu kulkas, metabolisme pertumbuhan bakteri akan bekerja secara minimum karena pada suhu rendah laju reaksi metabolik menurun energi kinetik molekul juga akan berkurang yang menyebabkan reaksi enzimatik sebagai penggerak metabolisme bakteri menjadi terhambat.⁽¹⁶⁾ Struktur membran bakteri menjadi lebih kaku dan kurang permeabel, produksi enzim metabolik lebih sedikit yang menyebabkan pertumbuhan bakteri lebih melambat.⁽¹⁷⁾ Namun hal itu tidak terlepas dari faktor lainnya yang dapat memicu metabolisme bakteri berjalan dengan cepat, seperti ketersediaan nutrisi di dalam media pembiakan yaitu urin sebagai produk sisa metabolisme tubuh yang berisi zat organik, anorganik maupun yang bersifat toksik. Ini akan semakin memicu pertumbuhan bakteri di dalamnya. Kondisi fisik lainnya yang dibutuhkan bakteri adalah peningkatan karbondioksida yang lebih tinggi di kulkas untuk metabolisme anabolik, regulasi pH, stimulasi enzim, sumber karbon utama dalam bentuk senyawa organik karbohidrat, glukosa, protein dan asam amino pada pertumbuhan bakteri, adanya oksigen yang tercukupi untuk respirasi, reaksi oksidasi dan pembentukan ATP terutamanya bakteri aerob, dan konsentrasi air di kulkas lebih tinggi dalam bentuk uap air atau embun. Bakteri memerlukannya sebagai media pengantar semua nutrisi yang dibutuhkan sel dan membuang zat yang tidak diperlukan keluar sel.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan analisis data menggunakan uji non-parametrik Mann Whitney U, tampak adanya perbedaan yang signifikan pada hasil perhitungan total kepadatan koloni di setiap teknik yang digunakan, namun dengan efektivitas akurasi kedua metode dapat digunakan dalam perhitungan jumlah koloni bakteri sesuai syarat rentang nilai d. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Azizah & Soesetyaningsih (2020) pada pengamatan metode *spread plate*, *drop plate* dan *pour plate* pada sampel daging sapi dengan pelarut BPW dan garam fisiologis dengan interpretasi bahwa ada perbedaan yang tidak terlalu signifikan. Hasil berbeda secara signifikan hanya terjadi jika dilarutkan dengan aquades.⁽¹⁸⁾

Penggunaan metode teknik kultur yang menunjukkan perbedaan dipertimbangkan dengan adanya kelemahan dan kelebihan yang dimiliki setiap metode sesuai dengan konsep bahwa metode *spread plate* memiliki kelebihan lebih sedikit resiko kontaminasi karena hanya permukaan agar yang terbuka dan koloni bakteri akan tumbuh pada permukaan agar saja sesuai dengan zona sebar tanam *hockey stick* dan menjadi lebih mudah untuk

menghitung koloni.^(19,20) Namun, pada metode ini koloni yang terbentuk berukuran lebih besar dan lebih banyak tumbuh koloni berantai dan bergerombol, sehingga hasil perhitungan koloni yang didapatkan jumlahnya akan lebih sedikit. Metode *pour plate* memiliki pertumbuhan bakteri kecil dan tunggal individu yang akan terdistribusi merata terpisah dengan baik di seluruh media dengan koloni yang terbentuk berasal dari satu sel yang memungkinkan perhitungan menjadi lebih rumit dan susah, memiliki resiko kontaminasi lebih tinggi karena diperlukan penuangan media cair secara langsung pada cawan agar dan akan lebih sulit untuk menghitung koloni individu karena bakteri akan tumbuh di dalam media agar.⁽²¹⁾

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa disimpulkan bahwa *pour plate* dan *spread plate* merupakan metode yang akurat dalam pemeriksaan jumlah bakteri dalam urin pada suhu ruang dan suhu kulkas. Kedua metode dapat digunakan dalam pemeriksaan kultur urine dengan nilai akurasi metode *pour plate* lebih tinggi dari pada metode *spread plate*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Karah N, Rafei R, Elamin W, Ghazy A, Abbara A, Hamze M, Uhlin BE. Guideline for urine culture and biochemical identification of bacterial urinary pathogens in low-resource settings. *Diagnostics*. 2020;10(10):832.
2. Razi A, Ghiaei A, Dolatabadi FK, Haghighi R. Unraveling the association of bacteria and urinary stones in patients with urolithiasis: an update review article. *Frontiers in Medicine*. 2024 Aug 30;11:1401808.
3. Sharma B, Mohan B, Sharma R, Lakhanpal V, Shankar P, Singh SK, Taneja N. Evaluation of an automated rapid urine culture method for urinary tract infection: Comparison with gold standard conventional culture method. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023 Mar 1;42:19-24.
4. Terrones-Fernandez I, Casino P, López A, Peiró S, Ríos S, Nardi-Ricart A, García-Montoya E, Asensio D, Marqués AM, Castilla R, Gamez-Montero PJ, Piqué N. Improvement of the pour plate method by separate sterilization of agar and other medium components and reduction of the agar concentration. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 14;11(1):e0316122. doi: 10.1128/spectrum.03161-22.
5. Ogodo AC, Agwaranze DI, Daji M, Aso RE. Microbial techniques and methods: Basic techniques and microscopy. *Analytical Techniques in Biosciences*. 2022;1(1):201-220.
6. Rizky VA, Siregar SA, Rahayu A, Krisdianilo V, Murti NT. *Escherichia Coli* bacterial colonies in patients with urinary tract infections using fresh and stored urine specimens. *ITEGAM-JETIA*. 2023 Feb 28;9(39):15-8.
7. Kiani AK, Naureen Z, Pheby D, Henahan G, Brown R, Sieving P, Sykora P, Marks R, Falsini B, Capodicasa N, Mierts S, Lorusso L, Dondossola D, Tartaglia GM, Ergoren MC, Dundar M, Michelini S, Malacarne D, Bonetti G, Donato K, Medori MC, Beccari T, Samaja M, Connelly ST, Martin D, Morresi A, Bacu A, Herbst KL, Kapustin M, Stuppia L, Lumer L, Farronato G, Bertelli M. Methodology for clinical research. *J Prev Med Hyg*. 2022 Oct 17;63(2 Suppl 3):E267-E278. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2769.
8. Childers R, Liotta B, Brennan J, Wang P, Kattoula J, Tran T, Montilla-Guedez H, Castillo EM, Vilke G. Urine testing is associated with inappropriate antibiotic use and increased length of stay in emergency department patients. *Heliyon*. 2022 Oct 12;8(10):e11049. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11049.
9. Werneburg GT, Rhoads DD. Diagnostic stewardship for urinary tract infection: A snapshot of the expert guidance. *Cleve Clin J Med*. 2022 Oct 3;89(10):581-587. doi: 10.3949/ccjm.89a.22008. PMID: 36192024.
10. Giuliano C, Patel CR, Kale-Pradhan PB. A guide to bacterial culture identification and results interpretation. *PT Report*. 2019 Apr;44(4):192-200. PMID: 30930604; PMCID: PMC6428495.
11. Frazee BW, Enriquez K, Ng V, Alter H. Abnormal urinalysis results are common, regardless of specimen collection technique, in women without urinary tract infections. *J Emerg Med*. 2015 Jun;48(6):706-11.
12. Parikh PC, Souza SD, Obeid W. Changes in the composition of urine over six hours using urine dipstick analysis and automated microscopy. *BMC Nephrol*. 2025 Jan 8;26(1):11.
13. Daley P, Gill Y, Midodzi W. Comparison of clinical performance of commercial urine growth stabilization products. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Nov;92(3):179-182. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.023.
14. Jung CE, Chopyk J, Shin JH, Lukacz ES, Brubaker L, Schwanemann LK, Knight R, Wolfe AJ, Pride DT. Benchmarking urine storage and collection conditions for evaluating the female urinary microbiome. *Sci Rep*. 2019;9(1):13409.
15. Zhou X, Li Y, Li Z, Xi Y, Nazim Uddin SM, Zhang Y. Investigation on microbial inactivation and urea decomposition in human urine during thermal storage. *J Water Sanit Hyg Dev*. 2017 Jun 5;7(3):378-386.
16. Hoque R, Labeed FH, Cirovic S, Hughes MP. Evaluating refrigeration and antibiotic treatment for maintaining urine electrophysiology. *PLoS ONE*. 2025;20(2):e0319089.
17. Hedström M, Møller M, Patsekina H, Damborg P, Jessen LR, Sørensen TM. The effect of urine storage temperature and boric acid preservation on quantitative bacterial culture for diagnosing canine urinary tract infection. *BMC Vet Res*. 2021 Dec 8;17(1):379. doi: 10.1186/s12917-021-03083-6.
18. Azizah A, Soesetyaningsih E. Akurasi perhitungan bakteri pada daging sapi menggunakan metode hitung cawan. *Berkala Saintek*. 2020;8(2):8-12.
19. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *J Vis Exp*. 2012 May 11;(63):e3064.
20. Hartman D. Perfecting your spread plate technique. *J Microbiol Biol Educ*. 2011 Dec 1;12(2):204-5.
21. Terrones-Fernandez I, Casino P, López A, Peiró S, Ríos S, Nardi-Ricart A, García-Montoya E, Asensio D, Marqués AM, Castilla R, Gamez-Montero PJ, Piqué N. Improvement of the pour plate method by separate sterilization of agar and other medium components and reduction of the agar concentration. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e0316122.