

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum pasien rawat inap yang terdiagnosa pneumonia di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi Surakarta

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sputum segar pasien rawat inap yang terdiagnosa pneumonia di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi Surakarta yang diambil secara acak sebanyak 40 sampel sputum pasien pneumonia.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dari penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien pneumonia di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi Surakarta

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji sensitivitas antibiotik ciprofloksasin, azitromisin, gentamisin, dan imipenem terhadap bakteri *Klebsiella sp.* pada pasien pneumonia.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi dari sputum pasien pneumonia.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah laboratorium, peneliti, sterilitas, medium, peralatan, kemurnian bakteri, jumlah bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminan yang mempengaruhi hasil penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari ciprofloxasin, azitromisin, gentamisin, dan imipenem terhadap bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi dari sputum pasien pneumonia di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi Surakarta

2. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sputum yang diambil yaitu sputum pada pagi hari dari pasien yang didiagnosis pneumonia. sputum adalah lendir dan materi lainnya yang dibawa dari paru-paru, bronkus, dan trakea yang mungkin dibatukkan dan dimuntahkan atau ditelan.

Kedua, isolasi adalah proses untuk memisahkan mikroorganisme dari organisme lain dengan cara kuadran pada cawan petri dengan goresan yang dilakukan pada media *Mac Conkey*.

Ketiga, *Klebsiella sp.* adalah bakteri hasil isolasi dari sputum pasien pneumonia yang menunjukkan hasil identifikasi positif bakteri *Klebsiella sp.* dengan cara menumbuhkan koloni pada media *Mac Conkey*, mikroskopis, dan uji biokimia

Keempat, cakram antibiotik imipenem adalah *disc* antibiotik imipenem dengan dosis 10 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kelima, cakram antibiotik gentamisin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia gentamisin dengan dosis 10 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Keenam, cakram antibiotik azitromisin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia azitromisin dengan dosis 15 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, cakram antibiotik siprofloksasin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia siprofloksasin dengan dosis 5 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji sensitivitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui sensitifitas bakteri *Klebsiella sp.* terhadap antibiotik ciprofloksasin, azitromisin, gentamisin, dan imipenem menggunakan metode difusi dengan medium MHA, dengan cara mengukur diameter hambat kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer* berdasarkan CLSI (2017)

Kesembilan, pola sensitivitas antibiotik adalah daya efektivitas dari suatu antibiotik dalam membunuh bakteri yang meliputi resisten, *intermediate*, *moderately* sensitif, dan sensitif, menurut tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*.

Kesepuluh, resistensi adalah mengindikasikan kuman yang tidak bisa dihambat oleh antibiotik, dalam kadar yang biasanya cukup untuk menghambat kuman tersebut. Diameter zona hambat Resistensi antibiotik imipenem, gentamisin, azitromisin, dan siprofloksasin berturut-turut adalah ≤ 19 mm, ≤ 12 mm, ≤ 12 mm, dan ≤ 15 mm. (CLSI, 2017)

Kesebelas, hasil *intermediate* adalah mengindikasikan kuman dengan KHM (kadar hambat minimum) antibiotik yang kadarnya kurang lebih sama, dengan kadar dalam darah atau jaringan sehingga angka responnya lebih rendah dari isolat kuman yang peka. Diameter zona hambat *Intermediate* antibiotik imipenem 20-22 mm, gentamisin 13-14 mm, azitromisin (-), dan siprofloksasin 16-20 mm. (CLSI, 2017)

Keduabelas, hasil sensitif yang mengindikasikan kuman yang dihambat oleh antibiotik dalam kadar yang biasanya untuk menghambat kuman tersebut. Hasil Diameter zona hambat sensitif antibiotik imipenem, gentamisin, azitromisin, dan siprofloksasin berturut-turut adalah ≥ 23 mm, ≥ 15 mm, ≥ 13 mm, dan ≥ 21 mm. (CLSI, 2017)

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan Petri steril, jarum ose, rak tabung reaksi, inkas, pinset, lampu spiritus, tabung reaksi, kapas lidi steril, jarum ent, botol penampung steril, vortex, objek glass, degglass, mikroskop binokuler, pipet volume, penggaris, mikropipet, beker glass, labu takar, dan gelas ukur.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien pneumonia dari ispa bagian bawah di Rumah Sakit Umum Daerah Ngipang, NaCl 0,9%, *Mac Farland*, *Mac Conkey*, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA) *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kligler's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), Citrat Agar, Kristal violet, *Lugol's iodine*, Tinta cina, Alkohol 95%, dan cakram antibiotik imipenem 10 μ g, gentamisin 10 μ g, azitromisin 15 μ g, dan siprofloksasin 5 μ g.

D.Jalannya Penelitian

1. Penyiapan medium pertumbuhan

Semua medium dipersiapkan dahulu sesuai komposisi dan dibuat sesuai cara pembuatannya, yaitu dengan cara media ditimbang sesuai dengan petunjuk di label dan dimasukkan dalam beker glass kemudian dilarutkan dengan air destilasi sampai volume tertentu. Campuran dididihkan hingga larut sempurna dan kondisi hingga pH-nya sesuai dengan persyaratan. Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disumbat dengan kapas kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit, setelah itu media didiamkan hingga suhu menjadi 50°C dan segera dituang ke dalam cawan petri steril, pekerjaan ini dilakukan secara aseptis.

2. Isolasi bakteri dari sputum pasien pneumonia

Isolasi bakteri dilakukan sesuai dengan standar kultur pada bagian Mikrobiologi. Pengambilan sputum dilakukan pada pagi hari sebelum makan karena sputum belum bercampur dengan bakteri yang berasal dari mulut. Sputum dikeluarkan langsung dan ditampung ke dalam pot steril yang berisi NaCl 0,9%, kemudian disentrifugasi. Hasil sentrifugasi pada bagian bawah yang berupa endapan dilanjutkan dengan penanaman pada media *Mac Conkey* yang telah disediakan. Kemudian setelah dilakukan penanaman, media diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 18 – 24 jam (ROHP, 2012).

3. Identifikasi Bakteri

3.1. Media Selektif. Sampel dari tabung *BHI* yang telah disuspensikan dengan bakteri *Klebsiella sp.* yang sudah keruh diambil dengan menggunakan kapas steril, kemudian dioleskan kedalam media *Mac Conkey* Agar sebagai media perbenihan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. (ROHP, 2012).

3.2. Mikroskopis. Identifikasi yang dilakukan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau negatif. Langkah pertama yang dilakukan pada pewarnaan Gram adalah mensuspensikan bakteri dengan ose, kemudian diletakkan pada obyek dan difiksasi di atas lampu spirtus,

ditetesi dengan larutan Gram A (kristal violet), didiamkan 1 menit, kemudian ditetesi dengan larutan Gram B (*Lugol's iodine*), didiamkan 2 menit lalu dibilas dengan air, ditetesi dengan larutan Gram C (alkohol 95%) didiamkan 30 detik atau sampai zat warna hilang, dan yang terakhir ditetesi dengan larutan Gram D (safranin) didiamkan 30 detik lalu dibilas dengan air. Hasil diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran lensa okuler 5 kali dan pembesaran lensa objektif 100 kali (Plezar, 2006).

3.3. Pewarnaan Kapsul. Prinsip dari pewarnaan kapsul yaitu kapsul pada kuman tidak dapat mengikat zat warna, sehingga pada pemberian cat tinta cina dan kristal violet terlihat bulatan terang atau transparan dengan latar belakang gelap dan badan bakteri berwarna merah. Pewarnaan kapsul dilakukan dengan menggunakan 2 objek glass yang bersih, 1 ose tinta cina diletakkan pada bagian pinggir salah satu objek glass dan dicampur dengan 1 ose bakteri. Kemudian dibuat hapusan dengan ujung objek glass yang lain dan dibiarkan sampai kering dan difiksasi. Ditetesi kristal violet dan didiamkan 1 menit, sisa cat dibuang dan dikeringkan, kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

3.4. Uji Biokimia

Media SIM, biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida, motilitas dan kemampuan bakteri menghasilkan indol dari triptofan.

Media KIA, biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan, diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C. identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida.

Media LIA, biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dengan goresan kemudian diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida.

. Media Citrat, biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu organisme dapat menggunakan citrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk metabolisme dengan menghasilkan suasana basa.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Satu sampai dua ose biakan *Klebsiella sp.* dimasukkan ke dalam media cair BHI (*Brain Heart Infussion*) 5 mL. Kekeruhan disamakan dengan standart Mac Farland 0,5 dengan jumlah sel sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Decroli *et al.*, 2008)

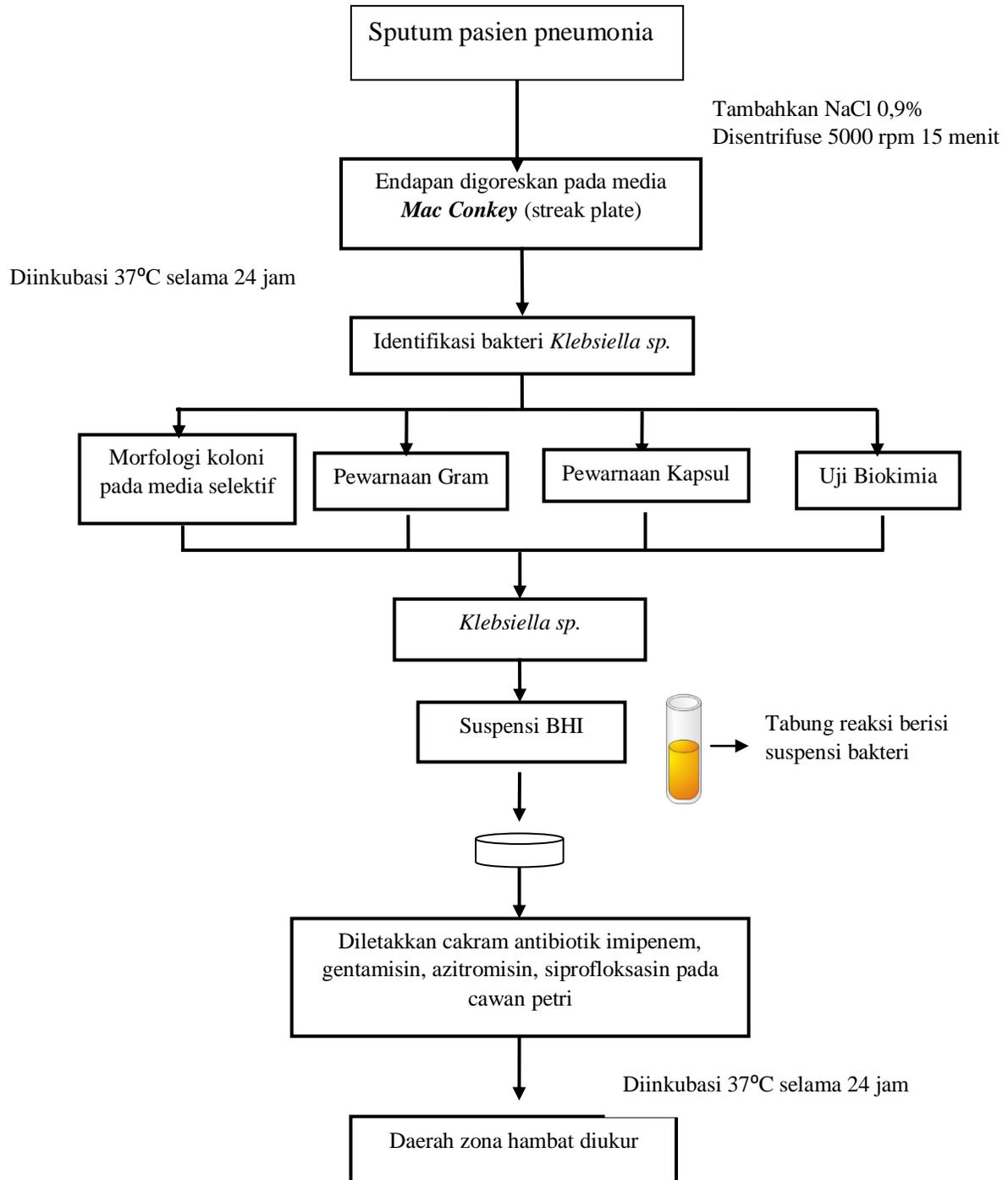
5. Pengujian Sensitifitas Antibiotik

Pengujian sensitifitas terhadap antibiotik dilakukan setelah proses identifikasi koloni bakteri. Digunakan metode *disk diffusion (Kirby Bauer method)* dan pedoman menurut tabel yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2017. Beberapa koloni bakteri terpisah dan murni diambil dengan ose steril kemudian dilarutkan dalam 2 ml larutan NaCl fisiologis sampai mencapai konsentrasi 0,5 Mc Farland atau setara dengan kepadatan sel bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Larutan NaCl fisiologis yang sudah berisi bakteri, kemudian divortex agar homogen. Lidi kapas steril dimasukkan ke dalam tabung larutan NaCl tersebut untuk mengambil inokulum bakteri dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit. selanjutnya larutan NaCl fisiologis yang telah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator, lidi kapas ditekan pelan ke permukaan bagian dalam dinding tabung yang berisi larutan NaCl tersebut dipastikan tidak ada kelebihan cairan, kemudian lidi kapas ditarik keluar dari tabung. Lidi kapas digoreskan di atas *Agar Mueller Hinton* untuk membuat *streaking* pada permukaan agar tersebut. Diatas *Agar Mueller Hinton* diletakkan cakram antibiotik dengan jarak sebesar 24 mm. *Agar Mueller Hinton* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri untuk semua jenis cakram antibiotik. Hasil pengukuran diameter hambatan pertumbuhan bakteri tersebut disesuaikan dengan tabel pengukuran sensitifitas antibiotik yang dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2017

E. Analisis Hasil

Hasil uji kepekaan antibiotik meropenem, imipenem, gentamisin, azitromisin, dan siprofloksasin terhadap *Klebsiella sp.* dari hasil isolasi sputum pasien pneumonia di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi Surakarta secara difusi cakram dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat antibiotik tersebut pada bakteri biakan murni *Klebsiella sp.* dianalisis terkait dengan pola sensitifitas antibiotik terhadap *Klebsiella sp.* dengan cara menggunakan diagram batang dan Tabulasi sesuai dengan standar *Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI)* 2017 dan diprosentasekan hasil diameter daya hambat dibandingkan dengan *Klebsiella pneumonia ATCC 10031*

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 8. Skema jalannya penelitian secara sistematis