

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum pasien terduga pneumonia yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi klinik di RSUD Dr. Moewardi pada bulan November 2018-Januari 2019.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum segar pagi hari yang diambil secara acak dari semua pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi pada bulan November 2018-Januari 2019.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama dari penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi pada bulan November 2018-Januari 2019.

Variabel utama kedua adalah uji sensitivitas *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi terhadap antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

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

**2.1. Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien terduga pneumonia.

**2.2. Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah suatu variabel yang variasinya dipengaruhi oleh variasi beberapa variabel lain. Variabel tergantung

dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin terhadap bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi pada bulan November 2018-Januari 2019.

**2.3. Variabel terkendali.** Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat dan tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah sterilitas, media, peralatan, jumlah bakteri, kondisi laboratorium, kondisi peneliti, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi yang mempengaruhi hasil penelitian.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, sputum adalah dahak yang diperoleh dari pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi. Sputum terbaik untuk pemeriksaan diambil pada pagi hari.

Kedua, isolasi adalah proses untuk memisahkan satu jenis mikroorganisme dari mikroorganisme lain dengan cara goresan yang dilakukan pada media MCA.

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

Keempat, cakram antibiotik amoksisilin-klavulanat adalah *disc* antibiotik augmentin yang mengandung agensia kimia amoksisilin dosis 20 µg dan asam klavulanat dosis 10 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

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

Keenam, cakram antibiotik seftriakson adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia seftriakson dengan dosis 30 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

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 kepekaan bakteri *Klebsiella sp.* terhadap antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin menggunakan metode difusi dengan medium MHA, dengan cara mengukur diameter hambat kemudian dibandingkan dengan tabel interpretasi zona hambatan Kirby-Bauer.

Kesembilan, pola sensitivitas antibiotik adalah daya efektivitas dari suatu antibiotik dalam membunuh bakteri yang meliputi *resistant*, *intermediate*, dan *susceptible*, menurut tabel interpretasi zona hambatan Kirby-Bauer.

Kesepuluh, hasil *resistant* adalah menandakan *Klebsiella sp.* yang tidak bisa dihambat oleh antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin menghasilkan diameter hambat berturut-turut adalah  $\leq 13$  mm,  $\leq 19$  mm,  $\leq 19$  mm, dan  $\leq 15$  mm (CLSI 2018).

Kesebelas, hasil *intermediate* adalah menandakan respon *Klebsiella sp.* lebih rendah dari isolat bakteri yang peka oleh antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin menghasilkan diameter hambat berturut-turut adalah 14-17 mm, 20-22 mm, 20-22 mm, dan 16-20 mm (CLSI 2018).

Keduabelas, hasil *susceptible* adalah menandakan *Klebsiella sp.* yang bisa dihambat oleh antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin menghasilkan diameter hambat berturut-turut adalah  $\geq 18$  mm,  $\geq 23$  mm,  $\geq 23$  mm, dan  $\geq 21$  mm (CLSI 2018).

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat antara lain autoklaf, oven, inkubator, lemari pendingin, penangas air, cawan petri steril, kapas lidi steril, kapas, jarum ose, jarum ent, pinset, pipet tetes, spuit, tabung reaksi, rak tabung reaksi, enkas, pembakar spiritus, botol penampung steril, objek glass, mikroskop binokuler,

mistar berskala/ penggaris, jangka sorong, beaker glass, gelas ukur, vortex, batang pengaduk, timbangan analitik, alat fotografi untuk dokumentasi, dan *cooler box*.

## **2. Bahan**

Penelitian ini menggunakan bahan-bahan antara lain sputum segar pagi hari, bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi sputum pasien terduga pneumonia di RSUD Dr. Moewardi pada bulan November 2018-Januari 2019, bakteri biakan murni *Klebsiella sp.* ATCC 10031, larutan standar Mc Farland 0,5, larutan NaCl 0,9%, tinta cina, pewarna Gram, *MacConkey Agar* (MCA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), Sitrat Agar, aquadest, alkohol, *ice gel pack*, cakram antibiotik meliputi amoksisilin-klavulanat (augmentin), meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Sterilisasi**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam oven dengan suhu 160°C selama 1 jam (Elliott *et al.* 2013). Pinset dan jarum ose disterilisasi langsung dengan fiksasi (dipijarkan dengan pembakaran di atas api langsung) (Joel *et al.* 2016; Patty *et al.* 2016). Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit (Elliott *et al.* 2013).

### **2. Penyiapan Medium Pertumbuhan**

Medium yang digunakan dalam penelitian dipersiapkan terlebih dahulu sesuai komposisi dan dibuat sesuai cara pembuatannya, yaitu dengan cara bahan media ditimbang sesuai dengan petunjuk di label, dimasukkan dalam beaker glass, dan dilarutkan menggunakan aquadest sampai volume tertentu. Campuran kemudian dididihkan hingga larut sempurna dan kondisi hingga pH-nya sesuai dengan persyaratan. Media dituangkan ke dalam tabung reaksi dan disumbat dengan kapas, kemudian dimasukkan dalam autoklaf untuk dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit, setelah itu media didiamkan

dahulu dan segera dituang ke cawan petri steril, pekerjaan ini dilakukan menggunakan teknik aseptis.

### **3. Isolasi Bakteri dari Sputum Pasien Terduga Pneumonia**

Isolasi bakteri dari sputum dilakukan sesuai dengan standar kultur pada bagian mikrobiologi. Sputum diambil pada pagi hari setelah bangun tidur dengan cara dikeluarkan langsung dan ditampung ke dalam pot steril yang berisi NaCl 0,9% (Joel *et al.* 2016), kemudian dilanjutkan dengan penanaman pada media MCA dengan metode cawan gores. Setelah itu, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18–24 jam (Goldman 2008).

### **4. Identifikasi Bakteri**

**4.1. Morfologi koloni pada media selektif.** Bakteri dari sputum pasien terduga pneumonia yang telah diinkubasi kemudian diidentifikasi dengan pemeriksaan koloni. Pemeriksaan koloni dilakukan untuk mengamati koloni yang diduga bakteri *Klebsiella sp.* pada media MCA, ditandai dengan koloni berwarna merah muda sampai merah bata, berbentuk bulat, ukuran kecil sampai dengan sedang, permukaan konveks, biasanya sangat mukoid, halus pinggir rata, dan diameter koloni 3-4 mm (Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008).

**4.2. Pewarnaan Gram.** Identifikasi yang dilakukan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bermanfaat dalam mikrobiologi diagnostik, bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau negatif. Spesimen yang dikirim ketika dicurigai terdapat infeksi bakteri harus dibuat apusan pada kaca objek, diberi pewarna Gram, dan diperiksa secara mikroskopis. Pewarnaan Gram dilakukan dengan mensuspensikan bakteri dengan ose, kemudian diletakkan pada kaca objek dan difiksasi di atas lampu spiritus, ditetesi dengan larutan Gram A (kristal violet), didiamkan 1 menit, kemudian ditetesi dengan larutan Gram B (*Iugol's iodine*), didiamkan 1 menit lalu dibilas dengan air, ditetesi dengan larutan Gram C (alkohol 95% dan aseton) didiamkan 30 detik atau sampai zat warna hilang, dan yang terakhir ditetesi dengan larutan Gram D (safranin) didiamkan 1 menit lalu dibilas dengan air (Brooks *et al.* 2012; Bisen 2014). Hasil yang didapat untuk bakteri *Klebsiella sp.* yaitu warna

koloni merah yang menunjukkan bakteri Gram negatif. Bakteri *Klebsiella sp.* berbentuk batang pendek dengan susunan menyebar (Rajeshwari *et al.* 2009).

**4.3. Pewarnaan kapsul.** Kapsul yang dimiliki bakteri berperan melindungi dari aksi fagositosis. Kapsul pada bakteri dapat diamati dengan menggunakan zat warna asam dan kristal violet. Metode ini berguna untuk memperbaiki visualisasi bakteri berkapsul dalam sampel klinis salah satunya adalah sputum. Prosedur pewarnaan ini meliputi pewarnaan latar belakang dengan zat warna asam seperti tinta cina, hal ini menyebabkan sel-sel tidak berwarna secara kontras. Kristal violet yang ditambahkan pada pewarnaan kapsul digunakan untuk memperjelas pengamatan sel bakteri di dalam kapsul. Prinsip pewarnaan kapsul yaitu zat warna asam tidak akan mewarnai sel melainkan mewarnai latar belakang dengan warna kontras (Brooks *et al.* 2012). Pewarnaan kapsul dilakukan dengan menggunakan 2 objek glass yang bersih, 1 ose tinta cina diletakkan pada bagian pinggir salah satu gelas objek, kemudian dicampur dengan 1 ose bakteri. Setelah itu diratakan dengan cara didorong menggunakan objek glass yang lain, ditetesi dengan larutan kristal violet, dibiarkan sampai kering, dan diperiksa di bawah mikroskop (Bisen 2014).

**4.4. Uji biokimia.** Uji biokimia dilakukan untuk identifikasi bakteri dengan media SIM, KIA, LIA, dan Sitrat. Media SIM, biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian menggunakan media SIM ini bertujuan untuk memeriksa adanya sulfida, motilitas, dan kemampuan organisme menghasilkan indol dari triptofan. Hasil untuk *Klebsiella sp.* meliputi sulfida negatif yaitu media tidak berwarna hitam, uji indol negatif yaitu tidak terbentuk cincin warna merah setelah ditambah dengan Erlich, dan uji motilitas negatif yaitu tidak terjadi pergerakan bakteri dalam media, sehingga hasilnya berturut-turut adalah - - - (Goldman 2008).

Media KIA, biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusuk gores kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian menggunakan media KIA ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida. Hasil untuk *Klebsiella sp.* yaitu bagian lereng akan berwarna kuning ditulis A, bagian dasar berwarna kuning ditulis A, media terangkat ke atas ditulis G, sulfida negatif tidak terbentuk warna hitam

pada media ditulis  $S^{(-)}$ , sehingga hasilnya adalah A/AG  $S^{(-)}$  (Goldman 2008; Brooks *et al.* 2013).

Media LIA, biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusuk gores kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian menggunakan media LIA ini bertujuan untuk mengetahui adanya dekarboksilasi atau deaminasi lisin untuk membentuk  $H_2S$ . Hasil untuk *Klebsiella sp.* yaitu lereng akan berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, tidak terbentuknya warna hitam pada media ditulis  $S^{(-)}$ , sehingga hasilnya adalah K/K  $S^{(-)}$  (Goldman 2008; Brooks *et al.* 2013).

Media Sitrat, biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian menggunakan media Sitrat ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu organisme dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk metabolisme dengan menghasilkan suasana basa. Hasil positif (+) untuk *Klebsiella sp.* yaitu apabila warna indikator dalam media berubah menjadi biru (Brooks *et al.* 2013).

## **5. Pembuatan Suspensi Bakteri**

Pembuatan suspensi bakteri yaitu dengan cara diambil 1 sampai 2 ose biakan *Klebsiella sp.* pada media MCA dimasukkan ke dalam media cair *Brain Heart Infussion* (BHI) 5 ml, diinkubasi selama 4-6 jam (Pollack *et al.* 2016). Kekeruhan yang diperoleh disamakan dengan standar Mc Farland 0,5 agar jumlah bakteri sama dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml (CLSI 2018).

## **6. Pengujian Sensitivitas Antibiotik**

Uji sensitivitas dilakukan menggunakan metode difusi Kirby-Bauer. Metode ini mempunyai prinsip penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu terbentuknya daerah jernih di sekitar cakram kertas yang mengandung zat antibakteri mengindikasikan sebagai zona hambatan (Harmita & Radji 2008). Suspensi bakteri sesuai dengan penyetaraan Mc Farland 0,5 yang sebelumnya telah dibuat diambil menggunakan kapas lidi steril, ditiriskan terlebih dahulu, diratakan ke atas permukaan media MHA, dan dibiarkan beberapa menit. Cakram antibiotik yang digunakan meliputi augmentin dengan kandungan

amoksisilin dosis 20 µg dan asam klavulanat dosis 10 µg, meropenem dosis 10 µg, seftriakson dosis 30 µg, dan siprofloksasin dosis 5 µg diletakkan secara hati-hati pada permukaan media MHA yang telah diratakan dengan suspensi bakteri pada jarak tertentu. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Hasil pengamatan didapatkan dengan cara mengukur diameter daya hambat dalam satuan milimeter dan dibandingkan terhadap tabel interpretasi zona hambatan Kirby-Bauer (CLSI 2018).

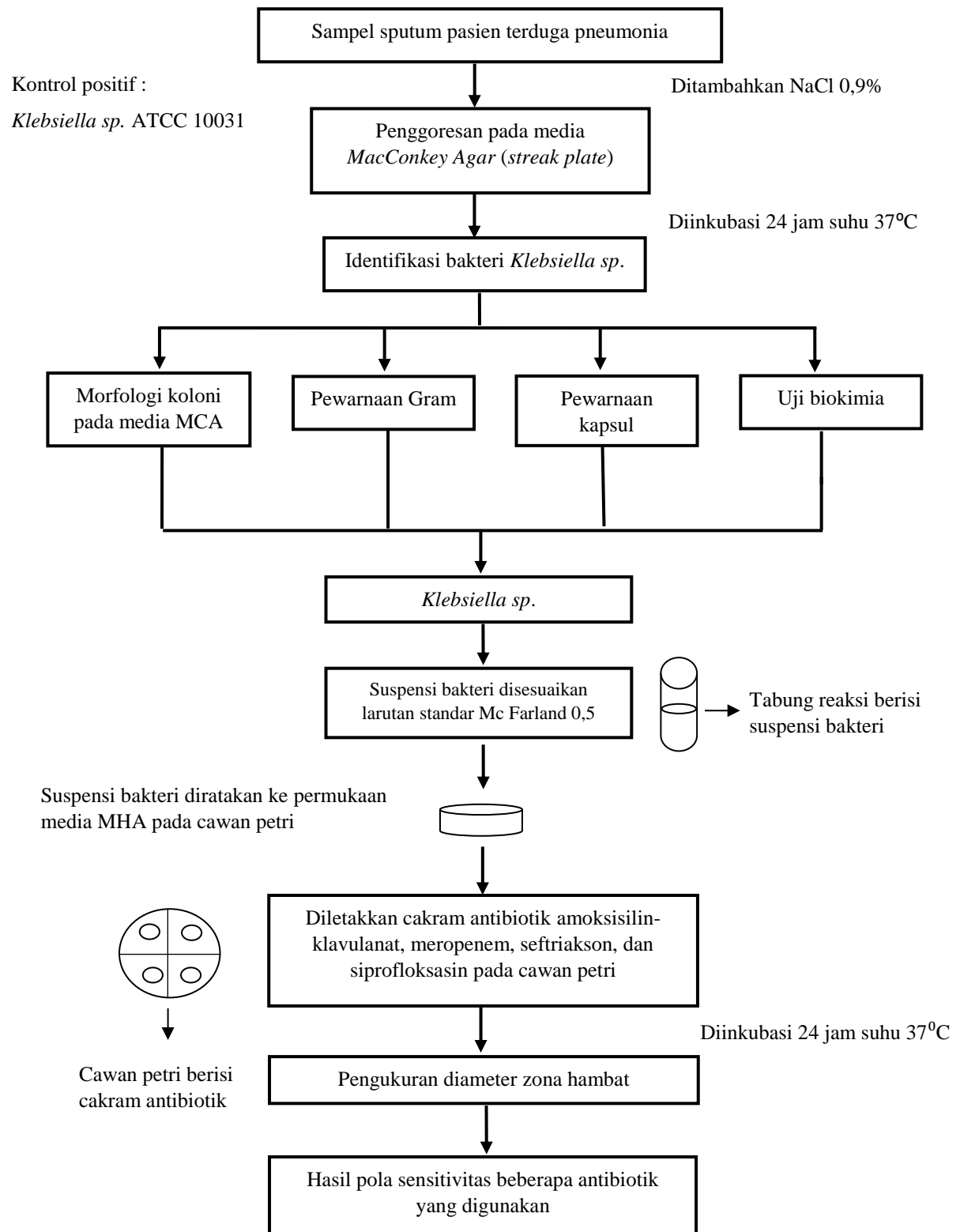
### E. Analisis Hasil

Uji sensitivitas bakteri *Klebsiella sp.* dari sputum pasien pneumonia di RSUD Dr. Moewardi terhadap antibiotik amoksisilin-klavulanat, meropenem, seftriakson, dan siprofloksasin menggunakan metode difusi Kirby-Bauer dikategorikan menjadi S (*susceptible*), I (*intermediate*), dan R (*resistant*). Hasil ini dapat diperoleh dengan cara mengukur diameter daya hambat dalam satuan milimeter dan dibandingkan terhadap tabel interpretasi zona hambatan Kirby-Bauer. Interpretasi zona hambatan Kirby-Bauer dapat dilihat pada tabel 1. Penilaian *susceptible*, *intermediate*, dan *resistant* tersebut kemudian ditabulasikan menjadi bentuk persentase pola sensitivitas.

Analisis data menggunakan uji Standar Deviasi (SD) yang dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat bakteri *Klebsiella sp.* dari sputum pasien pneumonia di RSUD Dr. Moewardi yang terbentuk pada bakteri biakan murni *Klebsiella sp.* ATCC 10031 terhadap masing-masing antibiotik yang digunakan dalam penelitian. Uji SD dinyatakan dalam bentuk grafik yang menampilkan *error bars*, dimana menunjukkan garis yang tidak bersinggungan dan garis yang bersinggungan dengan *error bars* bakteri *Klebsiella sp.* ATCC 10031 sebagai acuan. Garis tidak bersinggungan jika data berbeda nyata, dan garis bersinggungan jika data tidak berbeda nyata.



### F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 6. Skema jalannya penelitian secara sistematis