

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin pasien yang terduga ISK di RSUD Kota Surakarta yang diperoleh dari laboratorium pada bulan November 2018-Januari 2019.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari suatu populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan memenuhi persyaratan random. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin sewaktu melalui aliran urin tengah (*mid stream*) dari pasien terduga penyakit ISK di RSUD Kota Surakarta.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji sensitivitas *Escherichia coli* terhadap antibiotik levofloksasin, kotrimoksazol, seftriakson, dan amoksisilin-klavulanat.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* dari urin pasien terduga infeksi saluran kemih.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dan tidak tersebar oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol

dalam penelitian ini adalah laboratorium, peneliti, media, sterilisasi, peralatan, jumlah bakteri, perlakuan yang aseptis sehingga mencegah terjadinya kontaminasi.

Variabel tergantung merupakan pusat masalah pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari antibiotik levofloksasin, kotrimoksazol, amoksisilin-klavulanat, dan seftriakson terhadap *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, sampel adalah urin dari pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta. Pengambilan urin dilakukan urin sewaktu yang diperoleh dari urin aliran pancar tengah.

Kedua, isolasi adalah proses pemisahan antara mikroorganisme satu dengan yang lain menggunakan media *Endo Agar*.

Ketiga, *Escherichia coli* adalah hasil isolasi dari urin pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta yang menunjukkan hasil identifikasi positif bakteri *Escherichia coli* secara morfologi koloni pada media *Endo Agar*, mikroskopis, dan uji biokimia.

Keempat, cakram antibiotik levofloksasin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia levofloksasin dengan dosis 5 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Kelima, kertas cakram antibiotik kotrimoksazol adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia kotrimoksazol dengan dosis 25 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Keenam, kertas cakram antibiotik amoksisilin-klavulanat adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia amoksisilin-klavulanat dengan dosis 30 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Ketujuh, kertas cakram antibiotik seftriakson adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia seftriakson dengan dosis 30 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi.

Kedelapan, uji sensitivitas antibiotik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui sensitivitas antibiotik levofloksasin, kotrimoksazol, seftriakson, dan amoksisilin-klavulanat terhadap bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien terduga infeksi saluran kemih dan dibanding dengan tabel standar interpretasi Kirby-Bauer.

Kesembilan, pola sensitivitas adalah efektivitas antibiotik dalam membunuh bakteri dilihat dari zona hambat yang meliputi *resistant*, *intermediate*, dan *susceptible*.

Kesepuluh, antibiotik levofloksasin adalah antibiotik dengan *disc content* 5 µg yang memiliki *resistant* daya hambat ≤ 13 mm, *intermediate* 14-16 mm dan *susceptible* ≥ 17 mm (CLSI 2018).

Kesebelas, antibiotik kotrimoksazol adalah antibiotik dengan *disc content* 25 µg yang memiliki *resistant* daya hambat ≤ 10 mm, *intermediate* 11-15 mm dan *susceptible* ≥ 16 mm (CLSI 2018).

Keduabelas, antibiotik seftriakson adalah antibiotik dengan *disc content* 30 µg yang memiliki *resistant* daya hambat ≤ 19 mm, *intermediate* 20-22 mm dan *susceptible* ≥ 23 mm (CLSI 2018).

Ketigabelas, antibiotik amoksisilin-klavulanat adalah antibiotik dengan *disc content* 30 µg yang memiliki *resistant* daya hambat ≤ 13 mm, *intermediate* 14-17 mm dan *susceptible* ≥ 18 mm (CLSI 2018).

Keempatbelas, resistensi menunjukkan antibiotik tidak dapat menghambat kuman dalam dosis lazim untuk menghambat kuman tersebut.

Kelimabelas, *intermediate* menunjukkan kuman dengan KHM (kadar hambat minimum) dengan antibiotik yang kadarnya sama pada kadar darah sehingga angka responnya lebih rendah dari isolat kuman yang peka.

Keenambelas, *susceptible* menunjukkan antibiotik dapat menghambat kuman dalam dosis lazim.

C. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pot steril, jarum ose dan ent steril, cawan petri steril, tabung reaksi, raktabung reaksi, inkas, lampu

spiritus, kapas lidi steril, oven, objek glass, timbangan analitik, mikroskop binokuler, pipet volume, pinset, batang pengaduk, beaker glas, gelas ukur, jangka sorong, erlenmeyer.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta.

2.2 Bahan Kimia, Larutan *Mc. Farland* 0,5, aquadestilata, reagen untuk pengecatan Gram yaitu Gram A (kristal violet), Gram B (*lugol's iodine*), Gram C (aseton : alkohol 95%), Gram D (safranin).

2.3 Media. *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kligler's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), Sitrat.

2.4 Bakteri pembanding, *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.5 Cakram antibiotika (levofloksasin 5µg, kotrimoksazol 25µg, amoksisilin-klavulanat 30 µg, dan seftriakson 30µg).

D. Jalan Penelitian

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang terbuat dari kaca dicuci dengan air bersih lalu dikeringkan dan dibungkus dengan kertas perkamen kemudian dilakukan sterilisasi secara panas kering menggunakan oven pada suhu 160-170°C selama 1-2 jam (Pratiwi 2008). Bahan-bahan tidak tahan pemanasan pada suhu tinggi yang terbuat dari bahan plastik dapat disterilisasi menggunakan bahan yang bersifat desinfektan atau metode ionisasi untuk penggunaan alat sekali pakai (pot steril) (Pratiwi 2008).

Bahan seperti media yang akan digunakan disterilisasi dengan cara autoklaf 121°C selama 15 menit, pada suhu tersebut sudah dapat membunuh sel vegetatif dan spora dari bakteri (Atlas 2010).

2. Penyiapan Media Pertumbuhan

Semua komposisi media dipersiapkan terlebih dahulu dan dibuat sesuai dengan prosedurnya, media ditimbang dan dilarutkan menggunakan aqua destilata

dan ditaruh dalam beaker glass. Campuran bahan didihkan hingga larut sempurna dan kondisi pHnya disesuaikan dengan persyaratan. Media cair dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup atau disumbat menggunakan kapas dan disterilkan secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah steril didiamkan pada suhu 35°C sehingga dapat dituang ke cawan petri steril untuk dilakukan penelitian, semua pengerjaan harus dilakukan secara aseptis.

3. Isolasi Bakteri ISK

Isolasi bakteri menggunakan sampel *Escherichia coli* yang didapat dari urin pasienterduga ISK secara acak di RSUD melalui aliran urin tengah. Urin dikeluarkan dan ditampung menggunakan pot steril, kemudian 2 ml urin ditanam pada media BHI diinkubasi dan dilakukan penanaman pada media *Endo Agar* yang telah disiapkan. Media yang telah ditanam bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan dilihat pertumbuhan koloni bakteri tersebut (Adzitey *et al.* 2015).

4. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

4.1 Morfologi koloni pada media selektif. Bakteri hasil isolasi dari urin dilanjutkan identifikasi dengan pemeriksaan koloni. Pemeriksaan koloni dilakukan untuk menduga bahwa terdapat bakteri *Escherichia coli* pada media *Endo Agar* yang telah diinkubasi ditandai koloni berwarna merah dan kilap logam (metalik) dengan koloni tunggal.

4.2 Mikroskopis. Identifikasi lanjutan yang dilakukan yakni pengecatan Gram untuk mengetahui bakteri tersebut masuk dalam kelompok Gram positif atau Gram negatif. Pembuatan preparat dilakukan dengan cara mensuspensikan bakteri menggunakan jarum ose diletakkan pada obyek glas lalu preparat yang telah jadi difiksasi di atas lampu spiritus. Preparat yang telah difiksasi ditetesi dengan larutan Gram A yang berisi Kristal violet didiamkan selama 1 menit lalu bilas dengan air mengalir, dilanjutkan tetesi dengan larutan Gram B (*lugol's iodine*) didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air, kemudian ditetesi dengan larutan Gram C yang berisi aseton dan alkohol 95% (1:1) didiamkan selama 30 detik sampai zat warna pada preparat memudar atau menghilang

kemudian dibilas dengan air mengalir, dilanjutkan dengan meneteskan preparat menggunakan larutan Gram D yang berisi safranin didiamkan selama 1 menit dan dibilas dengan air serta keringkan di udara (Cornelissen *et al.* 2015). Hasil yang didapat untuk bakteri *Escherichia coli* saat dilakukan pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 100X yakni bakteri berwarna merah, berbentuk batang, terlihat bergerombol atau berpasangan (Cornelissen *et al.* 2015).

4.3 Uji Biokimia. Hasil inkubasi bakteri *Escherichia coli* pada media *Endo Agar* diambil kurang lebih satu koloni dilanjutkan uji biokimia menggunakan media *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kligler's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), dan sitrat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

4.1.1 Media Sulfide Indol Motility (SIM), biakan bakteri diinokulasikan tusukan pada media SIM lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil sulfida negatif (-), motilitas positif (+), indol positif (+) pada *Escherichia coli* jika sulfida pada media tidak terbentuk, uji indol akan terbentuk cincin berwarna merah apabila ditambah dengan Erlich A dan B, serta terdapat motilitas jika terjadi pertumbuhan bakteri pada media SIM.

4.1.2 Media Kligler's Iron Agar (KIA), memiliki bentuk padat, keadaan miring, dan berwarna merah. Bakteri diinokulasikan secara tusukan dan gores pada media KIA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian untuk mengetahui fermentasi karbohidrat (laktosa dan glukosa) serta sulfida. Hasil menunjukkan positif *Escherichia coli* apabila A/AG S⁽⁻⁾ memberikan jawaban bagian lereng berwarna kuning (A), bagian dasar berwarna kuning (A), media akan terangkat keatas (G), dan tidak terbentuk sulfida warna hitam S⁽⁻⁾.

4.1.3 Media Lysine Iron Agar (LIA), media yang mengandung glukosa, asam amino lisin, dan brom kresol ungu sebagai indikator pH serta mengandung natrium tiosulfat. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan dekarboksilasi lisin. Biakan bakteri diinokulasikan secara tusukan dan gores pada media LIA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pada *Escherichia coli* positif K/K S⁽⁻⁾ yakni lereng dan dasar media akan berubah warna menjadi ungu serta media tidak terbentuk warna hitam.

4.1.4 Media Sitrat, bakteridiinokulasikan secara goresan pada media sitrat lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji ini akan memberikan hasil positif jika media berubah menjadi warna biru. Hasil negatif pada *Escherichia coli* karena media tetap berwarna hijau. Tujuan identifikasi ini untuk mengetahui bahwa mikroorganisme tersebut dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama untuk melakukan metabolisme dengan menghasilkan suasana basa.

5. Pembuatan Suspensi Bakteri

Satu ose dari biakan bakteri *Escherichia coli* pada media *Endo Agar* dimasukkan dalam media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) dilakukan inkubasi pada suhu 37°C. Kekeruhan suspensi bakteri disamakan dengan standart *Mc Farland* 0,5 jumlah sel sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

6. Pengujian Sensitivitas Antibiotik

Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi dengan cakram Kirby-Bauer. Prinsip dari metode ini adalah pertumbuhan mikroorganisme akan dihambat dan terlihat zona bening atau jernih diantara cakram antibiotik yang digunakan. Media yang digunakan pada pengujian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang dicairkan dan dituang ke cawan petri steril. Media MHA yang telah didinginkan, diambil biakan bakteri dari suspensi yang telah dibuat menggunakan kapas lidi steril diusapkan keseluruh permukaan media MHA. Cakram antibiotik yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi levofloksasin 5µg, kotrimoksazol 25 µg, amoksisilin-klavulanat 30µg, dan seftriakson 30µg pada media MHA dengan jarak kurang lebih sama diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan sebanyak 3x replikasi.

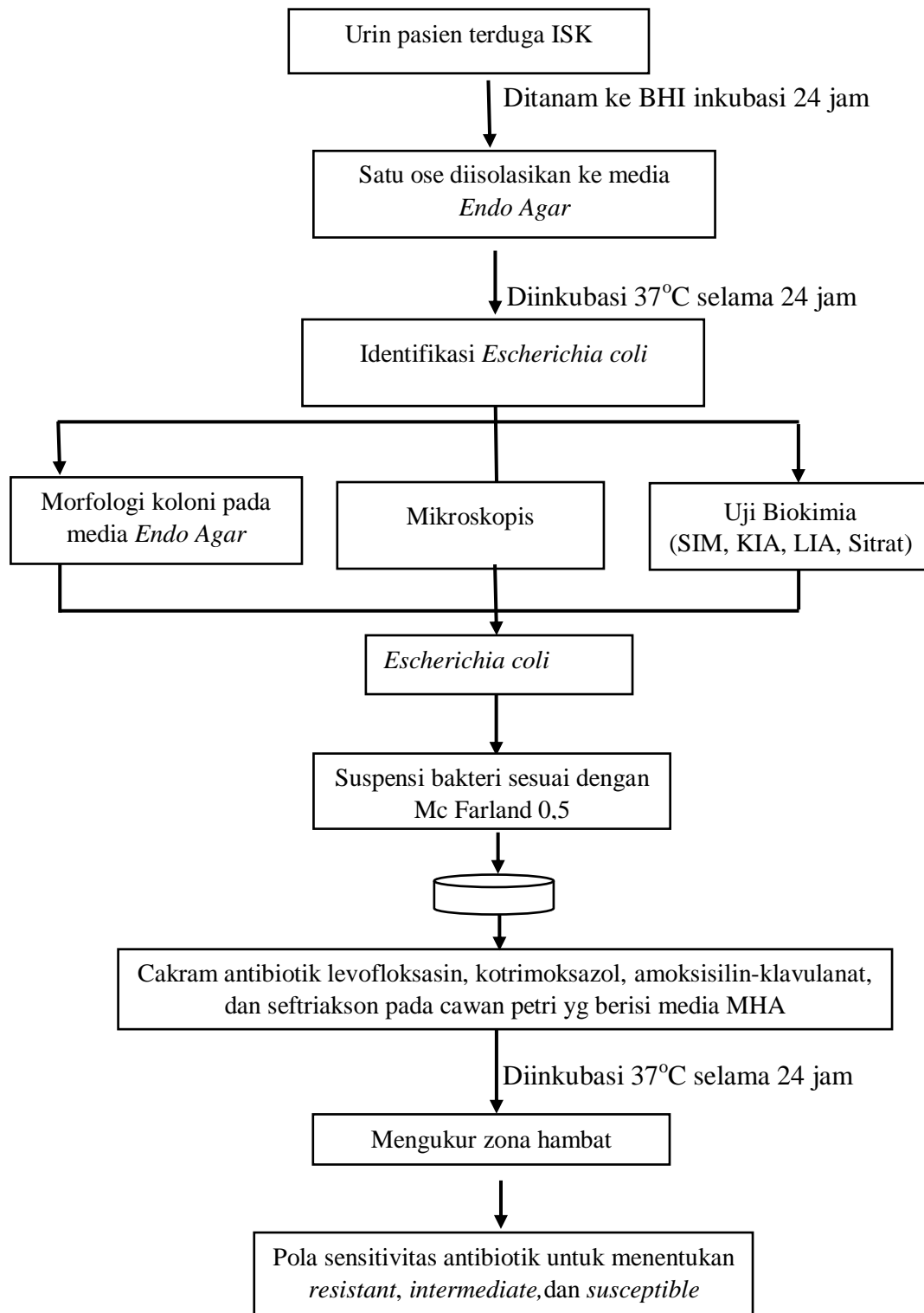
E. Analisa Data

Pengujian sensitivitas bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari urin pasien terduga ISK di RSUD Kota Surakarta terhadap antibiotik levofloksasin, kotrimoksazol, seftriakson, dan amoksisilin-klavulanat dilakukan replikasi sebanyak 3x.

Diameter daya hambat persampel pasien terhadap masing-masing antibiotik dibandingkan antara *Escherichia coli* hasil isolasi dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 untuk melihat ada atau tidak adanya perbedaan yang nyata. Data dianalisis menggunakan standar deviasi *error bar* antara *Escherichia coli* hasil isolasi dengan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Analisa data untuk membandingkan sensitivitas antara antibiotik levofloksasin, kotrimoksazol, seftriakson, dan amoksisilin-klavulanat menggunakan tabulasi dan persentase sensitivitas berdasar CLSI 2018.

F. Skema Jalan Penelitian



Gambar 6. Skema jalannya penelitian