

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah urin pasien yang diduga menderita infeksi saluran kemih yang diperoleh di Laboratorium RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah urin hasil isolasi yang di ambil secara acak dari pasien yang diduga infeksi saluran kemih di RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari – April 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama adalah *Klebsiella sp.* dari isolasi sampel urin di Laboratorium RSUD Dr. Moewardi bulan Februari – April 2019.

Variabel utama kedua adalah uji sensitivitas *Klebsiella sp.* terhadap antibiotik fosfomisin, amoksisilin-klavulanat, siprofloksasin dan kotrimoksazol.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas untuk penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi dari sampel urin yang di peroleh dari Laboratorium Mikrobiologi RSUD Dr. Moewardi yang akan diuji kepekaannya terhadap antibiotik.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter daya hambat cakram antibiotik terhadap adalah bakteri *Klebsiella sp.* hasil isolasi dari sampel urin di RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah laboratorium, peneliti, sterilisasi, media, peralatan, kemurnian bakteri, jumlah bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi.

3. Definisi operasional variabel

Pertama, Sampel urin adalah sampel yang diambil dari pasien rawat inap infeksi saluran kemih RSUD. Dr. Moewardi Surakarta.

Kedua, *Klebsiella sp.* adalah bakteri yang didapat dari RSUD. Dr. Moewardi Surakarta yang diambil dari sampel urin. Sampel diidentifikasi dengan metode biokimia dan koloni.

Ketiga, Isolasi adalah suatu proses memisahkan mikroorganisme dari mikroorganisme lainnya dengan cara goresan yang dilakukan pada *Mac Conkey Agar*.

Keempat, Cakram siprofloksasin adalah disc antibiotik yang mengandung agensi kimia siprofloksasin 5 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Kelima, Cakram kotrimoksazol adalah disc antibiotik yang mengandung agensi kimia kotrimoksazol 1,25/23,75 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Keenam, Cakram fosfomisin adalah disc antibiotik yang mengandung agensi kimia fosfomisin 200 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Ketujuh, Cakram amoksisilin-klavulanat adalah disc antibiotik yang mengandung agensi kimia amoksisilin-klavulanat 20/10 µg yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Kedelapan, Uji sensitivitas antibiotik adalah pengujian antibiotik dengan metode difusi *Kirby Bauer* yang ditunjukkan dengan zona jernih pada sekitar cakram antibiotik, kemudian dibandingkan dengan tabel *Kirby Bauer*.

Kesembilan, Pola sensitivitas antibiotik adalah daya efektivitas dari suatu antibiotik dalam membunuh bakteri yang meliputi *resistant*, *intermediate*, *moderately susceptible*, dan *susceptible* (CLSI 2015).

Kesepuluh, *Resistant* adalah mengindikasikan kuman yang tidak bisa dihambat oleh antibiotik, dalam kadar yang biasanya cukup untuk menghambat kuman tersebut berdasarkan tabel Zona Diameter Interpretive Standart Kirby Bauer.

Kesebelas, *Intermediate* adalah menandai kuman dengan KHM (konsentrasi hambat minimum) antibiotik yang kadarnya kurang lebih sama, dengan kadar dalam darah atau jaringan sehingga angka responnya lebih rendah dari isolat kuman yang peka.

Keduabelas, Hasil *moderately susceptible* kuman patogen yang infeksiya dapat diatasi dengan dosis aman maksimal untuk terapi strain bakteri dengan hasil *moderately susceptible* dikategorikan sebagai sensitive bukan *intermediate*.

Ketigabelas, Hasil *susceptible* adalah menandai kuman yang bisa dihambat oleh antibiotik dalam kadar yang biasanya untuk menghambat kuman tersebut.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pot urin steril, cawan petri steril, jarum ose, tabung reaksi, inkas, lampu spiritus, timbangan analitik, jarum ent, botol penampung steril, objek glass, mikroskop binokuler, pipet volume, batang pengaduk, pinset, kapas lidi steril, gelas ukur, beaker glass, penggaris, jangka sorong dan labu spiritus.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Urin pasien infeksi saluran kemih di RSUD. Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Februari – April 2019.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest, larutan standart Mc. Farland 0,5, NaCl, reagen untuk pewarnaan kapsul yaitu, tinta cina dan Gram A (larutan kristal violet), minyak emersi.

2.3 Media. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah *Mac Conkey Agar* (MCA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kingler Iron Agar* (KIA), Urea, Citrate.

2.4 Bakteri pembanding. Bakteri pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan alat dan bahan

Media yang digunakan yaitu media MCA, MHA, SIM, KIA, Urea dan *Citrate* disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan dengan suhu 121⁰C selama 15 menit. Alat seperti cawan petri, beker glass, tabung reaksi, gelas ukur dicuci dengan menggunakan air bersih lalu dikeringkan dan kemudian dibungkus dengan kertas. Alat-alat yang telah dibersihkan dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan oven pada suhu 170-180⁰C selama 2 jam.

2. Isolasi Bakteri

2.1 Isolasi bakteri dan sampel urin. Bakteri *Klebsiella sp.* yang diambil adalah bakteri yang berasal dari sampel urin di RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Urin dikeluarkan langsung dan ditampung ke dalam pot steril kemudian setelah sampel sampai, dilakukan penanaman pada media MCA yang telah disediakan. (Winahyu 2011).

2.2 Inkubasi. Inkubasi dilakukan setelah menanam pada media MCA, dengan cara media tersebut diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37⁰C selama 24 - 48 jam.

3. Identifikasi Bakteri Uji

3.1 Makroskopis.

3.2.1. Morfologi koloni pada media selektif. Pemeriksaan koloni pada media selektif dilakukan dengan cara : sampel urin digoreskan pada media MCA kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam setelah diinkubasi dilakukan 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, mukoid, halus pinggir rata, dan ukuran koloni rata-rata 1 mm.

3.2 Mikroskopis

3.2.1. Pewarnaan Kapsul. Pewarnaan kapsul untuk mengetahui adanya kapsul pada bakteri. Pewarnaan tersebut dilakukan dengan cara : pertama, diambil satu ose suspensi biakan bakteri dan satu tetes tinta china (1:1) diletakkan didekat

ujung kanan object glass. Kedua, lalu buat hapusan setipis mungkin. Ketiga, diamkan hingga kering. Keempat, preparat digenangi dengan pewarna kristal violet selama 5 menit, setelah itu cuci preparat dan kering udarakan. Kelima, amati dengan mikroskop perbesaran 100x. Hasil menunjukkan sel bakteri akan tampak sebagai bagian yang kosong dengan latar belakang gelap.

3.3 Uji Biokimia.

3.3.1. Uji pada media *Kliger's Iron Agar* (KIA). Koloni bakteri pada media MCA diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan ditanam pada media KIA dengan cara tusuk gores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. KIA ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida. Hasil untuk *Klebsiella sp.* adalah A/AG S⁻, 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⁻.

3.3.2. Uji pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM). Koloni bakteri pada media MCA diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan ditanam pada media SIM dengan cara ditusuk selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi pada SIM ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida, motilitas dan kemampuan organisme menghasilkan indol dari triptofan. Hasil untuk *Klebsiella sp.* sulfida negatif, yaitu media tidak berwarna hitam, uji indol negatif yaitu tidak terbentuk lereng warna merah setelah ditambah dengan Erlich, dan uji motilitas negatif yaitu tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada media.

3.3.3. Uji pada media urea. Koloni bakteri pada media MCA diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan ditanam pada media urea dengan cara tusuk kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi ini bertujuan mengetahui apakah kuman mempunyai enzim urease yang dapat menguraikan urea membentuk amoniak. Hasil yang ditunjukkan untuk *Klebsiella sp.* adalah apabila menghasilkan warna merah muda dan negatif apabila warna tidak berubah.

3.3.4. Uji pada media *Citrate*. Koloni bakteri pada media MCA diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan ditanam pada media *Citrate* dengan

cara digores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah suatu organisme dapat menggunakan citrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk metabolisme dengan menghasilkan suasana basa. Hasil (+) untuk *Klebsiella sp.* yaitu bila media berubah menjadi berwarna biru.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Isolasi bakteri dari media *Mac Conkey Agar* (MCA) diinokulasikan pada media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kekeruhan yang didapat sama dengan standart Mac Farland 0,5 dengan jumlah sel sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU ml.

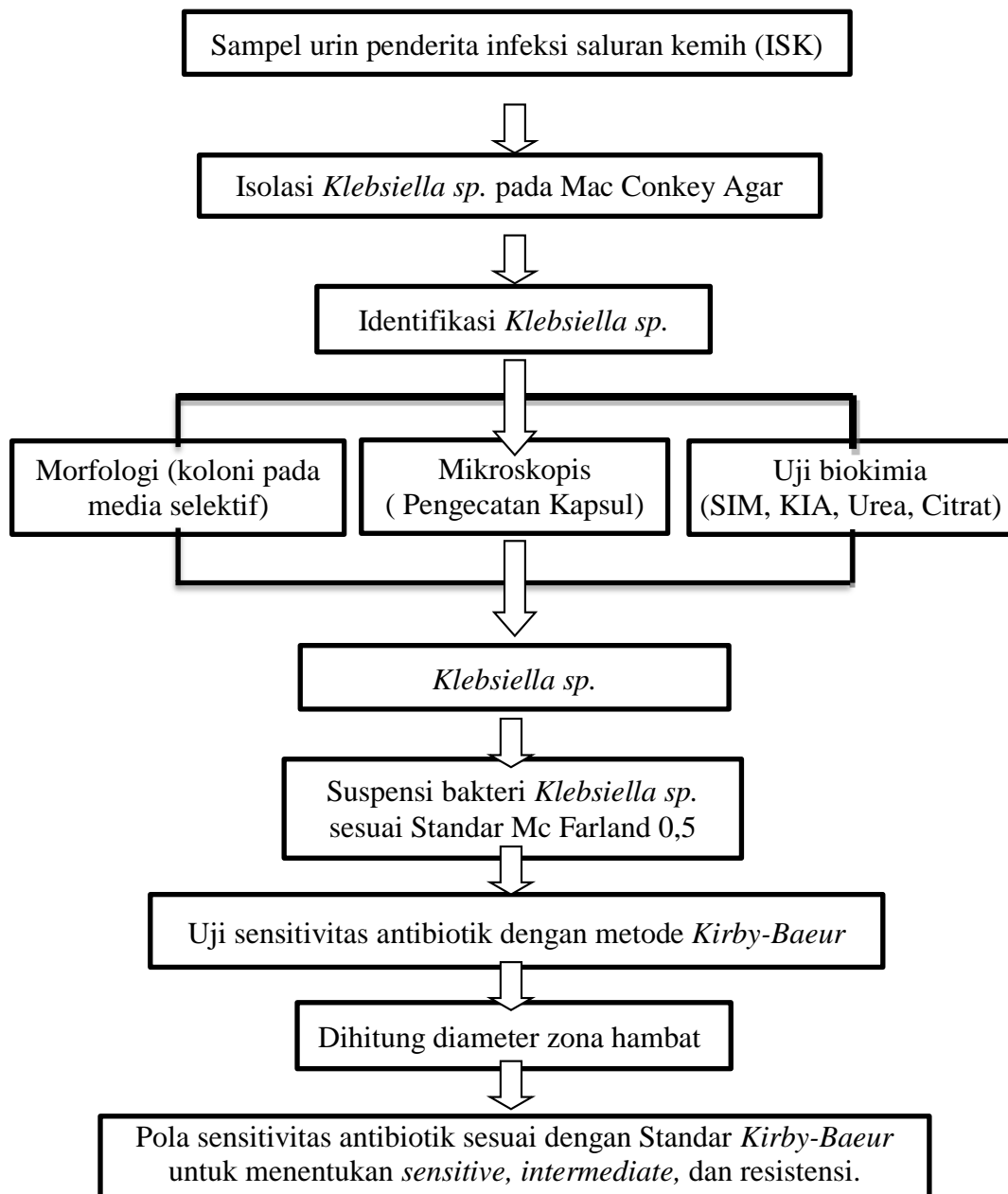
5. Uji Sensitivitas antibiotik dengan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pengujian dilakukan secara difusi dengan cakram *Kirby Bauer*. Pertama, medium MHA yang telah dicairkan dituang kedalam cawan petri steril dan ditunggu memadat. Kedua, kapas lidi steril dimasukkan dalam suspensi bakteri yang sudah distandarkan dengan Mc Farland 0,5 kemudian diinokulasikan ke dalam medium MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media. Cakram antibiotik diletakkan pada medium MHA dengan jarak yang sama. Ketiga, medium MHA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar cakram.

E. Teknik Analisis Data

Hasil penelitian berupa data jumlah tertentu bakteri *Klebsiella sp.* dari urin pasien yang didiagnosa menderita infeksi saluran kemih pada RSUD Dr. Moewardi Surakarta serta diameter daya hambat antibiotik siprofloksasin, kotrimoksazol, fosfomisin dan amoxisillin-klavulanat dilakukan analisis secara statistik dengan replikasi 3X. Data diameter daya hambat dibandingkan dengan CLSI ditabulasi dan diprosentasekan. Data diameter daya hambat *Klebsiella sp.* hasil isolasi dengan *Klebsiella sp.* ATCC dengan menggunakan uji standar devisiasi.

F. Jalannya Penelitian



Gambar 1. Jalannya Penelitian