BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik komparatif dan dengan pendekatan *cross sectional*. Dengan melakukan analisis keberadaan ESBL terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang diambil dari feses tenaga medis lalu dibandingkan dengan keberadaan ESBL pada *Klebsiella pneumoniae* yang terdapat di dalam feses perawat di ruang rawat inap dewasa dan ruang rawat inap anak.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Rumah Sakit Abdul Moelek, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan di Laboratorium Kesehatan Daerah Lampung. Selama 3 bulan, yaitu terhitung dari bulan September hingga November 2015.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah perawat yang berkerja diruang rawat inap dewasa dan anak Rumah Sakit Abdul yang berjumlah 77 orang.

3.3.2 Kriteria Inklusi

Adapun Kriteria Inklusi sebagai berikut :

1. Perawat yang bekerja diruang rawat inap anak dan dewasa di RSUD Abdul Moeloek.
2. Responden Bersedia Untuk Mengikuti penelitian dan menandatangani *Inform consent.*

3.3.3 Kriteria Ekslusi

Adapun Kriteria Inklusi sebagai berikut :

1. Perawat yang sedang sakit
2. Responden mengkonsumsi antibiotik dan imunosupresan
3. Responden tidak hadir saat pengambilan sampel atau pengumpulan sampel.

3.3.4 Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih secara tertentu dan dianggap mewakili populasinya. Pada uji ini rancangan acak lengkap, besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus *Slovin* :

$$n = \frac{N}{1 + N(d^2)}$$

Keterangan :

n : Jumlah Sampel
N : Jumlah Populasi
d : Tingkat Kepercayaan/Ketepatan (0,05)

$$n = \frac{77}{1 + 77(0{,}05^2)}$$

$$n = \frac{77}{2{,}21925} \quad n = 64\ sampel$$

Teknik pengambilan sampling yaitu *Stratified disproportionate sampling*, masing-masing diambil 32 sampel dari ruang rawat inap dewasa dan ruang rawat inap anak.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi, jarum Ose, cawan petri, l-glass, bekaer glass, jangka sorong, bunsen, pinset steril, kapas lidi steril, *handscoon*, masker, rak tabung reaksi, gelas ukur (*PyrexR*), labu *erlenmeyer* (*PyrexR*), batang pengaduk (*PyrexR*), pipet mikro (*TranferpetteR*), kertas perkamen, timbangan analitik, spatel, mikroskop, penggaris, inkubator (*GallenkampR*), autoklaf (*All AmericanR*), lemari aseptis, laminar air flow (*EscoR*), lemari pendingin, *hot plate* (*IECR*), penggaris, *vortex*.

3.4.2 Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat bakteri dari feses perawat diruang rawat inap dewasa dan anak RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung, biakan bakteri, antibiotik (amoksisilin klavulanat, cefotaxim, ceftazidim, amoksisilin, tobramicin, gentamicin, ampisilin, cefadroxil,

cefuraxime, sulfametoxazol, ciprofloxacin, dan norfloxacin**),** NaCl fisiologis**,** aquades steril**,** *Paper disk/cakram* antibiotik**,** spiritus, media agar *Muller Hinton*, untuk menguji pola resistensi antibiotik pada isolat bakteri, larutan standar *Mc Farland, nutrient Broth.*

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel Penelitian

Variabel independen dari penelitian ini yaitu, *Klebsiella pneumonia* yang berasal dari ruang rawat inap anak dan dewasa di RSUD Abdul Moeloek.

Variabel dependen dari penelitian ini yaitu, ESBL (+)

3.5.2 Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada **Tabel 1** sebagai berikut:

Tabel 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil	Skala
Variabel Independen: *Klebsiella pneumoniae*	Makhluk hidup yang merupakan flora normal usus, yang biasanya ditemukan di feses (sekitar 5%)	Media kultur Uji biokimia	Observasi Test Resistensi	1 : *Klebsiella pneumoniae* pada perawat di rawat inap dewasa 0 : *Klebsiella pneumoniae* pada perawat di rawat inap anak	Nominal
Variabel dependen: ESBL	enzim yang mempunyai kemampuan menghidrolisis antibiotik golongan penicillin, cephalosporin generasi I, II, III serta golongan aztreonam. Apabila diameter zona hambat > 5 mm DDT dikatakan ESBL (+) sedangakan diameter zona hambat < 5 mm DDT dikatakan ESBL (-)	Uji DDT	menggunakan cefotaxim (30 µg) serta ceftazidim (30 µg) dengan atau tanpa klavulanat (30 µg) diletakkan ditengah dan ceftazidim dan cefotaxim dikiri kanan dengan berjarak 15/20 mm dari disk amoksicillin-clavulanat 20/10 µg, dengan menggunakan media Mueller-Hinton agar	1 :ESBL (+) 0 : ESBL(-)	Nominal

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan dipakai disterilkan terlebih dahulu dengan cara dicuci bersih dan dikeringkan, cawan petri dibungkus dengan kertas perkamen. Alat-alat gelas seperti tabung reaksi, gelas ukur dan labu *Erlenmeyer* yang ditutup mulutnya dengan kapas steril yang dibalut dengan kain kasa steril lalu dibungkus dengan kertas

perkamen, kemudian disterilkan semuanya dalam autoklaf pada suhu 1210 C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset, jarum ose, dan kaca objek disterilkan dengan cara flambir. *Laminar air flow* disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 5 menit. Lemari aseptis dibersihkan dari debu lalu disemprot dengan alkohol 70%, dibiarkan selama 15 menit (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002).

3.6.2 Penyiapan dan Pembuatan Media

1. Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

65 g serbuk media *Triple Sugar Iron* Agar dilarutkan dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan hingga mendidih, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121^0 C tekanan 15 lbs, dibiarkan membeku pada posisi miring.

2. Media *Sulfite Indol Motility* (SIM)

30 g serbuk media SIM dilarutkan dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan hingga melarut, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121^oC tekanan 15 lbs.

3. Media Urea Agar (UA)

24,02 g serbuk media *Urea Christensen* Agar dilarutkan dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan hingga mendidih, setelah itu disterilkan selama 20 menit pada 121^oC tekanan 15 lbs. Pada tempat terpisah, dilarutkan 400 g Urea dalam 1 L *aquadest*,

disterilkan dengan penyaringan, setelah itu secara aseptik dicampurkan 50 mL larutan urea ke dalam 95 mL larutan urea agar, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL dan dibiarkan membeku dalam posisi miring.

4. Media *Simmons Citrate* Agar (SC)

24,2 g serbuk *Simmons Citrate* dilarutkan dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan hingga mendidih, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 1210 C tekanan 15 lbs.

5. *Mueller Hinton* Agar (MHA)

38 g serbuk Mueller Hinton Agar dilarutkan dalam 1 L aquadest, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit, setelah steril dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002).

3.6.3 Pengambilan dan transpor sampel tinja

1. Sampel diambil dari perawat RSUD Abdul Moeloek sebaiknya diambil pagi hari supaya tiba di laboratorium sebelum tengah hari, sehingga dapat diperiksa pada hari itu juga.
2. Spesimen tinja yang segar lebih baik dibandingkan apusan rektum, tetapi apusan rektum dapat diterima jika pengambilan spesimen tidak dapat dilakukan segera atau jika transpor tinja ke laboratorium tetunda (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002)

3.6.4 Prosedur untuk mengumpulkan bahan tinja

1. Berikan kepada perawat Pot penampung Feses yang telah disediakan.
2. Cara pengambilan sampel (feses) dijelaskan oleh peneliti kepada responden (perawat).
3. Spesimen harus mengandung sedikitnya 5 g tinja dan jika ada bagian yang mengandung darah, lendir, pus. Hindari tinja tercemar urine. Begitu spesimen telah ditempatkan pada penampung tutupnya harus segera disegel.
4. Jika spesimen tidak memungkinkan untuk dikirim ke laboratorium dalam waktu 2 jam setelah pengumpulan, sejumlah kecil spesimen harus diambil dengan dua atau tiga lidi kapas dan dimasukkan kedalam penampung dengan media transpor (Cary-Blair, Stuart, atau Amies) atau 33mmol/l buffer gliserol fosfat. (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002)..

3.6.5 Pemeriksaan visual spesimen tinja

1. Periksalah sampel tinja secara visual dan catat yang berikut ini :

   a. Konsistensinya (berbentuk, tidak berbentuk (lembek), atau cair).

   b. Warnanya (putih, kuning, coklat, hitam).

   c. Keberadaan komponen abnormal (lendir atau darah).

2. Tempatkan sedikit spesimen tinja atau apusan rektum dalam setetes larutan metilen biru 0,05% pada kaca objek bersih dan campur secara merata.
3. Letakkan kaca penutup pada suspensi yang telah diwarnai, jangan sampai terbentuk gelembung udara. Tunggu 2-3 menit. Periksalah sediaan dibawah mikroskop menggunakan lensa objektif pembesaran 100 x. (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002).

3.6.6 Isolasi Bakteri dari Sampel Feses

Sampel feses yang berasal dari perawat sebanyak ±1 gram feses, kemudian dilarutkan ke dalam 10 ml larutan penyubur BHI inkubasi 37ºC selama 6 jam. Feses yang telah disuburkan dengan media BHI diinokulasikan pada *Mac Conkey* diinkubasi pada suhu 37°C slama 24 jam di dalam inkubator, hari berikutnya diamati koloni yang tumbuh. (*Sulfur Indole Motility*) (Steven *et al*, 2004)

3.6.7 Identifikasi bakteri/Uji biokimia

1. Identifikasi Bakteri

Pembiakan bakteri Gram positif menggunakan media selektif lempeng agar darah dan Gram negatif menggunakan lempeng agar *Mac Conkey*. Setelah ditemukan koloni tertentu dari media selektif maka untuk Gram negatif koloni terduga bakteri dari *Mac Conkey* agar dapat dilakukan uji biokimia dengan

menanamnya pada TSIA (*Triple Sugar Iron* Agar), *Simmon's citrate* Agar, dan Media SIM.

2. Uji Katalase

Uji katalase berguna dalam mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase sehingga dapat dibedakan antara bakteri aerob dan anaerob. Uji katalase dilakukan dengan cara, di atas kaca objek ditetesi satu tetes H_2O_2 3%, kemudian ditambahkan koloni bakteri dan langsung diamati terjadinya penguraian hidrogen peroksida. Hasil dinyatakan positif apabila menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Hasil dinyatakan negatif apabila tidak ada gelembung udara.

3. Uji Fermentasi Glukosa pada medium TSIA

Uji fermentasi glukosa pada medium TSIA digunakan untuk membedakan organisme enterik berdasarkan kemampuannya memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa pada medium. Uji reaksi TSI Agar dilakukan dengan cara, koloni yang diuji dipindahkan ke agar miring TSIA dengan cara menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya. Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24-48 jam. Diamati perubahanperubahan sebagai berikut: Pada bagian tegak, jika bakteri dapat memfermentasi glukosa, warna media berubah dari ungu menjadi kuning. Tidak memfermentasi sukrosa, media tetap ungu. Dapat membentuk gas H_2S, warna media berubah

dari ungu menjadi hitam, karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H_2S, dan H_2S akan bereaksi dengan Fe^{2+} yang terdapat pada media yang menghasilkan endapan hitam. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa, warna media berubah jadi kuning, tidak dapat memfermentasi laktosa atau sukrosa, warna media tetap merah atau tidak berubah.

4. Hidrolisis *Tryptophan* dan Motilitas Bakteri pada Medium SIM

Uji hidrolisis *tryptophan* digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis *tryptophan* menjadi indol. Uji ini dilakukan dengan cara, diino-kulasikan 1 ose bakteri pada medium SIM kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu diteteskan *reagen Ko-vacks* (terdiri dari dimetil amino benzaldehid, namyl alkohol & HClp), jika terbentuk cincin merah berarti indol positif dan jika terbentuk cincin kuning berarti indol negatif. Terbentuknya cincin merah menandakan positif karena bakteri mem-bentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan dari bakteri. Uji motilitas dilakukan dengan cara, satu ose bakteri ditanam secara tegak lurus di tengah-tengah Medium SIM dengan cara ditusukkan, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bila timbul kekeruhan seperti kabut menandakan bakteri bergerak.

5. **Uji Penggunaan Sitrat pada Medium SC**

   Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Uji sitrat dilakukan dengan cara, diambil 1 ose bakteri dan diinokulasikan ke dalam medium Simmon Citrate Agar, diinkubasi pada suhu 35^{0}C selama 48-96 jam, warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif.

6. **Uji Hidrolisis Urea**

   Uji hidrolisis urea dilakukan untuk melihat bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease. Uji hidrolisis urea dilakukan dengan cara, digoreskan 1 ose biakan pada permukaan Urea Agar miring, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Timbulnya warna merah muda berarti reaksi positif dan negatif warna tidak berubah (Bonang, Gerard dan Koeswardono, 2002).

3.6.8 Uji Resistensi

Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dan telah diketahui konsentrasinya. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah agar *Mueller Hinton.* Cara *Kirby-Bauer* merupakan suatu metode uji sensitivitas bakteri yang dilakukan dengan membuat suspensi bakteri pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) cair dari koloni pertumbuhan kuman 24 jam, selanjutnya disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair (diinkubasi 4-8 jam pada

suhu 37°C). Hasil inkubasi bakteri diencerkan sampai sesuai dengan standar konsentrasi kuman 108 CFU/ml (CFU : Coloni Forming Unit). Suspensi bakteri diuji sensitivitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar. Disk antibiotik diletakkan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam.

Prosedur Uji Resistensi Antibiobiotik :

1. Larutan *Mueller Hinton Agar* dituangkan pada cawan petri yang telah disterilkan terlebih dahulu kemudian ditunggu beberapa menit hingga larutan *Mueller Hinton Agar* mengeras.
2. Bakteri diambil dengan menggunakan ose, kemudian dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,9%.
3. Suspensi bakteri disesuaikan dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5.
4. Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 µl dengan menggunakan mikropipet.
5. Kemudian diusapkan bakteri tersebut ke seluruh permukaan agar *Mueller Hinton* (MHA) dengan menggunakan *hockey stick.*
6. Kuman dibiarkan menempel pada media agar *Mueller Hinton* (MHA) selama 5 menit.
7. Lalu diletakkan 12 cakram antibiotika pada media yang telah ditanami *Klabsiella pneumoniae.*

8. Sediaan ini di inkubasi kedalam inkubator pada suhu 37$_o$ C selama 24 jam
9. Setelah inkubasi, daerah bening yang terbentuk disekitar cakram antibiotik diukur diameternya, sebagai diameter daya hambat antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri uji.
10. Ukur diameter daya hambat masing – masing antibiotik.

Tabel 2 Kriteria penilaian diameter zona hambatan beberapa antibiotik untuk bakteri *Enterobacteriaceae* berdasarkan CSLI (Clinical Laboratory Standards Institude, 2013).

No	Disc Antibiotika	Kode	Potensi	Resistensi (mm)	Intermediate (mm)	Sensitif (mm)
1.	Ampicilin	AMP	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
2.	Gemtamicin	GM	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
3.	Tobramicin	TOB	30 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
4.	Ciprofloxacin	CIP	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
5.	Norfloxacin	NOR	10 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
6.	Sulfametoxazol/ Trimetropim	SXT	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
7.	Amoksisilin	AML	30 µg	≤ 13	14-15	≥ 18
8.	Cefadroxil	CFR	30 µg	≤ 15	15-19	≥ 20
9.	Cefuroxime	CXM	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
10.	Cefotaxime	CTX	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16
11.	Ceftazidime	CTZ	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
12.	Amoksisilin Klav	AMC-K	30 µg	≤ 13	14-15	≥ 18

11. Untuk semua *Klebsiella pneumoniae* yang memberikan gambaran resisten dan intermediet terhadap ceftazidime 30µg dan atau cefotaxime 30µg dilakukan uji konfirmasi dengan metode *Disc Diffusion Test* (DDT). (D'Azevedo *et al*., 2004).

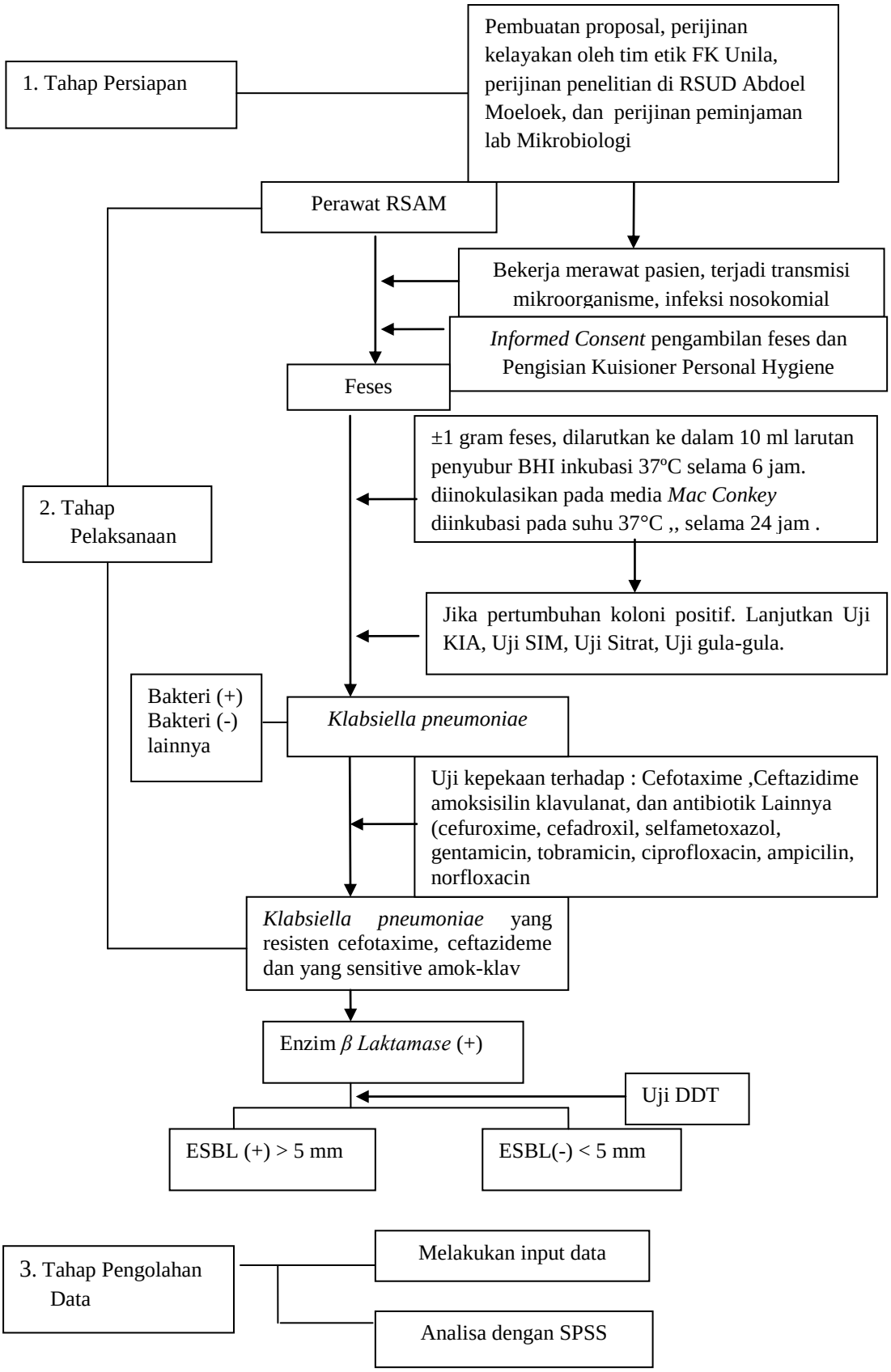
3.6.9 Uji konfirmasi dengan Metode difusi Kirby Bauer menggunakan *Disc Diffusion Test* (DDT).

1. Larutan *Mueller Hinton* Agar dituangkan pada cawan petri yang telah disterilkan terlebih dahulu, kemudian tunggu

beberapa menit hingga larutan *Mueller Hinton* Agar mengeras.

2. bakteri diambil dengan menggunakan ose, kemudian dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,9%.
3. Suspensi bakteri disesuaikan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.
4. Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 µl dengan menggunakan mikropipet.
5. kemudian diusapkan bakteri tersebut keseluruh permukaan agar *Mueller Hinton* dengan menggunakan hockey stick.
6. Kuman dibiarkan menempel pada media agar *Mueller Hinton* selama 5 menit.
7. Lalu diletakkan cakram antibiotika ceftazidime 30 µg, cefotaxime 30 µg, dan amoksicillin-clavulanate 20/10 µg secara sejajar pada media yang telah ditanami *Klabsiella pneumoniae* jarak antara disk adalah 15-20 mm.
8. sediaan ini diinkubasi kedalam inkubator pada suhu 37^0 C selama 24 jam. Bakteri penghasil ESBL, jika terjadi peningkatan zona hambat dari disk antibiotika cefotaxime 30 µg dan ceftazidime 30 µg kearah disk yang mengandung amoksiklav > 5 mm (D'Azevedo *et al.,* 2004; Sharma, 2013).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 7 Alur penelitian

3.8 Analisis Data

Analisis statistika untuk mengolah data yang diperoleh akan menggunakan program *software* pengolah data dimana akan dilakukan menggunakan analisa univariat dan bivariat. Analisa bivariat ini digunakan untuk menentukan distribusi frekuensi variabel bebas dan variabel terkait. Pengujian hipotesis analisa bivariat menggunakan uji korelasi *Chi Square* untuk melihat besar hubungan antara masing-masing variabel bebas dengan diameter zona hambat.

3.9 Aspek Penelitian

3.9.1. Persetujuan Setelah Penjelasan (*Informed Consent*)

Penelitian ini membutuhkan "Persetujuan Setelah Penjelasan" atau *Informed Consent* dari subjek yang bersangkutan.

3.9.2. Etika Penelitian

Penelitian ini mengikuti kaidah sesuai etika penelitian yang berlaku dengan merahasiakan semua data pasien yang ada sehingga sampel dari pasien tidak dapat dilacak keberadaannya. Setelah dilakukan Seminar Proposal maka, penelitian ini akan diajukan kepada komite etik penelitian Fakultas Kedokteran Universita Lampung untuk mendapatkan *ethical clearance*.