

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Daerah, Rumah Sakit Umum DR. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dalam waktu 4 bulan mulai Oktober 2011 sampai Januari 2012.

B. Bahan dan Alat Penelitian.

1. Bakteri Sampel

Bakteri sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat klinik *E. coli* yang berhasil diisolasi dari balai Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung dan RSAM Bandar Lampung selama 3 bulan.

2. Cakram Antibiotika

Cakram yang digunakan adalah cakram antibiotika ceftazidime 30 µg, cefotaxime 30 µg serta cakram amoksisilin-clavulanat 20/10 µg.

3. Media perbenihan

Media perbenihan yang digunakan adalah media agar Mc Conckey, agar Mueller Hinton (MHA), dan agar miring nutrient.

4. Bahan Kimia

Bahan kimia yang dipakai untuk isolasi, identifikasi dan uji kepekaan antibiotika *E. coli* adalah, reaksi gula-gula, serta pereaksi untuk uji biokimia.

5. Alat Penelitian

Alat yang dipakai adalah lemari pengeraman (inkubator), autoklaf, oven, tabung reaksi dan rak tabung, pipet hisap, gelas ukur, cawan petri, lampu spiritus, ose, stopwatch, neraca analitik, penggaris, dan *hockey stick*

C. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Eksperimen laboratorik, dan tidak dilakukan analisis secara statistik. Sensitifitas *E. coli* terhadap cefotaxime dan ceftazidime dilakukan dengan metode difusi Kirby Bauer. Sensitifitas *E. coli* terhadap cefotaxime dan ceftazidime diperoleh dengan mengukur besarnya diameter zona hambat yang dihasilkan.

Untuk semua *E. coli* yang resisten dan atau intermediet terhadap ceftazidime 30 µg atau cefotaxime 30 µg dilakukan uji konfirmasi dengan metode *Double Disk Sinergy Test*. Disk antibiotika yang digunakan yaitu ceftazidime, cefotaxime masing-masing dengan kadar 30 µg dan amoksisillin-clavulanat 20/10 µg. Peningkatan zona diameter hambat kearah disk yang mengandung

amoksiklav (amoksicillin-clavulanat) merupakan hasil test yang positif memproduksi enzim ESBL (D'Azevedo, *et al*, 2004).

D. Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus.

Sterilisasi dengan menggunakan oven pada suhu 160° C selama kurang lebih 1 jam.

2. Teknik Pembuatan Agar *Mueller Hinton* (MHA)

Sebanyak 15,2 gram agar *Mueller Hinton* dilarutkan dalam 400 ml *aquades*, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai larut. Media agar disterilkan di autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C tekanan 15 Psi. Lalu agar dituangkan kedalam cawan petri steril dan didiamkan hingga dingin dan padat pada suhu kamar (Maliku, 2010).

3. Teknik Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

Pembuatan larutan standar Mc Farland dengan cara dicampurnya 9,5 ml larutan H_2SO_4 1% dengan 0,5 ml larutan $BaCl_2$ 1% sehingga volume menjadi 10 ml, lalu dikocok sampai homogen. Larutan harus diocok setiap akan digunakan, untuk membandingkan suspensi bakteri (Maliku, 2010).

4. Uji Sensitifitas : Uji Saring dengan Metode Difusi Kirby Bauer.

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 cakram antibiotika ceftazidime 30 µg dan cefotaxime 30 µg pada media yang telah ditanami *E. coli*.
8. Sediaan ini di inkubasi kedalam inkubator pada suhu 37° 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. Diameter daya hambat antibiotik ceftazidime dan cefotaxime.

Tabel 1. Kriteria Resistensi Pada Antibiotik Ceftazidime dan Cefotaxime

Antibiotik	Resisten(mm)	Intermedia(mm)	Sensitif (mm)
Ceftazidime 30 µg	≤ 14	14-17	≥ 18
Cefotaxime 30 µg	≤ 14	14-22	≥ 23

11. Untuk semua *E. coli* yang memberikan gambaran resisten dan intermediet terhadap ceftazidime 30µg dan atau cefotaxime 30µg dilakukan uji konfirmasi dengan metode *Double Disk Sinergy Test* (D'Azavedo., *et al*, 2004).

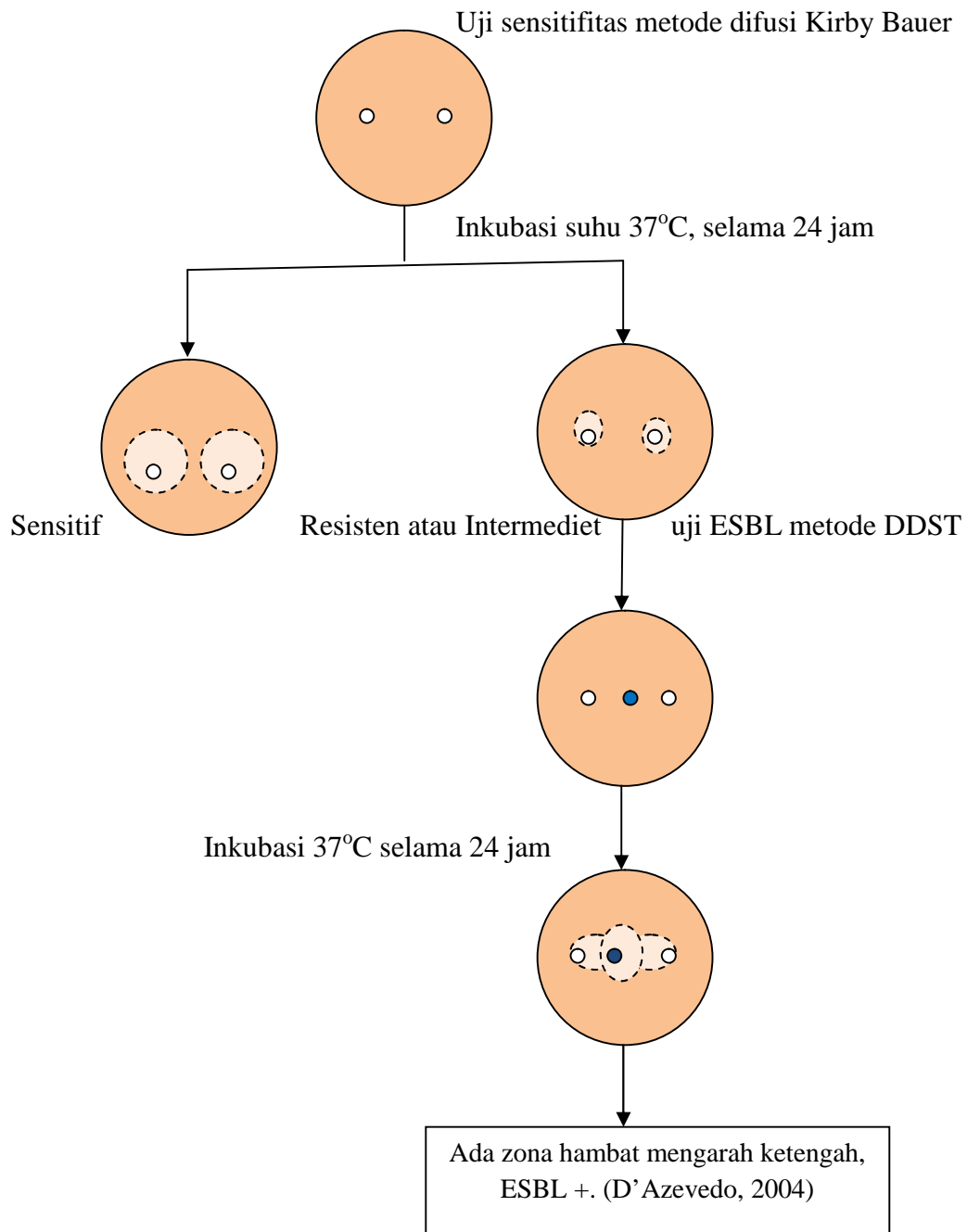
5. Uji Konfirmasi dengan Metode Difusi Kirby Bauer menggunakan *Double Disc Sinergy Test*.

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* (MHA) dengan menggunakan *hockey stick*.

6. Kuman dibiarkan menempel pada media agar *Mueller Hinton* (MHA) selama 5 menit.
7. Lalu diletakkan cakram antibiotika ceftazidime 30 µg, cefotaxime 30µg dan amoksisillin-clavulanate 20/10 µg secara sejajar pada media yang telah ditanami *E. coli*. Jarak antara disk adalah 15-20 mm.
8. Sediaan ini diinkubasi kedalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam.

Bakteri sampel adalah penghasil ESBL, jika terjadi peningkatan zona hambat dari disk antibiotik cefotaxime 30 µg dan ceftazidime 30 µg kearah disk yang mengandung amoksiklav (D'Azevedo, *et al*, 2004).

Prosedur Penelitian



Keterangan :

- Amoksisillin-clavulanate 20/10 µg
- cefotaxime 30 µg , ceftazidime 30 µg.

Gambar 3. Prosedur penelitian dengan metode *Double Disc Sinergy Test*

(DDST).

E. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah seluruh pasien yang telah dilakukan kultur mikroorganisme di RSAM dan LABKESDA Bandar Lampung.

2. Sampel Penelitian.

Sampel adalah pasien yang pada isolat kliniknya ditemukan bakteri *E. coli*.

F. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

Isolat klinik *E. coli* yang resisten atau intermediet terhadap ceftazidim atau cefotaksim.

Kriteria Eksklusi

Tidak ada.

G. Variabel Penelitian

1. variable bebas

Bakteri *E. coli* resisten atau intermediet terhadap ceftazidim atau cefotaksim

2. variable terikat

peningkatan zona hambat kearah disk amoksiklav.

H. Definisi Operasional

1. *E. coli* yang resisten terhadap ceftazidim atau cefotaksim adalah *E. coli* masih tetap tumbuh walaupun diberi ceftazidim atau cefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap cefotaksim 14 mm dan ceftazidim 14 mm.
2. *E. coli* yang intermediet terhadap ceftazidim atau cefotaksim adalah *E. coli* masih dapat tumbuh tapi tidak dapat dibunuh oleh seftazidim atau cefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap cefotaksim 15-22 mm dan ceftazidim 15-17 mm.
3. *E. coli* yang sensitif terhadap ceftazidim atau cefotaksim adalah *E. coli* yang dapat dibunuh oleh ceftazidim atau cefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap cefotaksim 23 mm dan ceftazidim 18 mm.
4. Keberadaan enzim ESBL positif adalah jika ada peningkatan zona hambat ke arah disk yang mengandung amoksiklav (D'Azevedo, *et al*, 2004).