

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

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

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bakteri sampel

Bakteri sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat klinik *Klebsiella pneumonia* yang berhasil diisolasi dari Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung dan Rumah Sakit Umum Abdul Moeloek Bandar Lampung selama bulan Oktober sampai Desember 2011.

2. Cakram Antibiotika

Cakram yang digunakan adalah cakram antibiotika seftazidim 30 µg, sefotaksim 30 µg, serta cakram amoksisiklav (amoksisilin- klavulanat) 20/10 µg.

3. Media Perbenihan

Media perbenihan yang digunakan adalah agar miring Nutrient, agar Mac Conkey, dan agar Muller Hinton (MHA).

4. Bahan kimia

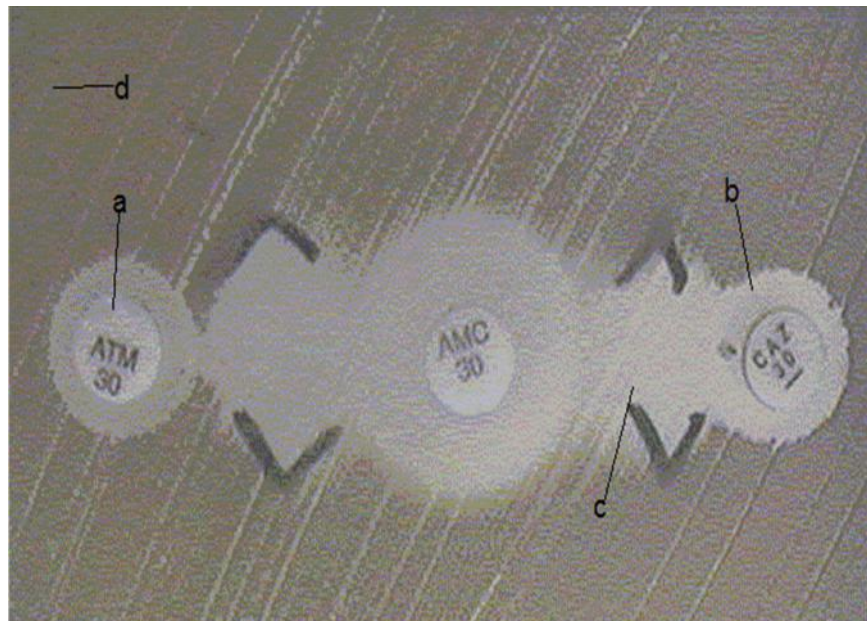
Bahan kimia yang digunakan adalah pereaksi gula-gula, pereaksi untuk uji biokomia.

5. Alat Penelitian

Alat yang dipakai adalah inkubator, autoklaf, oven, tabung reaksi dan rak tabung, pipet hisap, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, lampu spiritus, ose, mikropipet, *hockey stick*, pinset, stopwatch, neraca analitik, penggaris.

C. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan metode difusi Kirby Bauer untuk menguji sensitifitas *Klebsiella pneumonia* terhadap antibiotika. Isolat *Klebsiella pneumonia* yang intermediet atau resisten terhadap seftazidim atau sefotaksim dilakukan uji konfirmasi dengan metode *Double Disk Synergy Test* menggunakan disk antibiotika seftazidim dan sefotaksim masing-masing dengan kadar 30 µg, dan disk amoksiklav 20/10 µg. Peningkatan zona hambat ke arah disk amoksiklav merupakan hasil test yang positif terhadap enzim ESBL. Hal ini terjadi karena amoksiklav berdifusi melalui agar dan menghambat enzim betalaktamase di sekitar disk seftazidim dan sefotaksim (Ahmed et al., 2010).



Gambar 2. Peningkatan zona hambat ke arah amoksislav
 Keterangan : a) disk antibiotik, b) diameter zona hambat,
 c) peningkatan zona hambat akibat sinergi antibiotik
 d) *Klebsiella pneumonia*

D. Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan dibersihkan dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus lalu disterilisasikan di oven pada suhu 160°C selama ± 1 jam (Andini, 2010).

2. Teknik pembuatan larutan standar Mac Farland

Pembuatan larutan standar Mac Farland dengan cara dicampurkannya 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 dikocok

setiap akan digunakan untuk dibandingkan dengan suspensi bakteri (Maliku, 2010).

3. Teknik pembuatan media *Mueller Hinton Agar*

Sebanyak 15,2 gram *Mueller Hinton Agar* dilarutkan dengan 400 mL akuades, dipanaskan sampai homogen, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 Psi selama 15 menit, setelah steril dituang ke cawan petri sebanyak 10 mL dengan ketebalan 0,4 cm (Raihana, 2011).

4. Teknik pembuatan suspensi bakteri

Koloni isolat bakteri diambil dengan ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril di dalam tabung sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan kadar kekeruhan Mac Farland 0,5. Standar Mac Farland 0,5 menunjukkan jumlah koloni bakteri di dalam suspensi berjumlah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Vandepitte *et al.*, 2010).

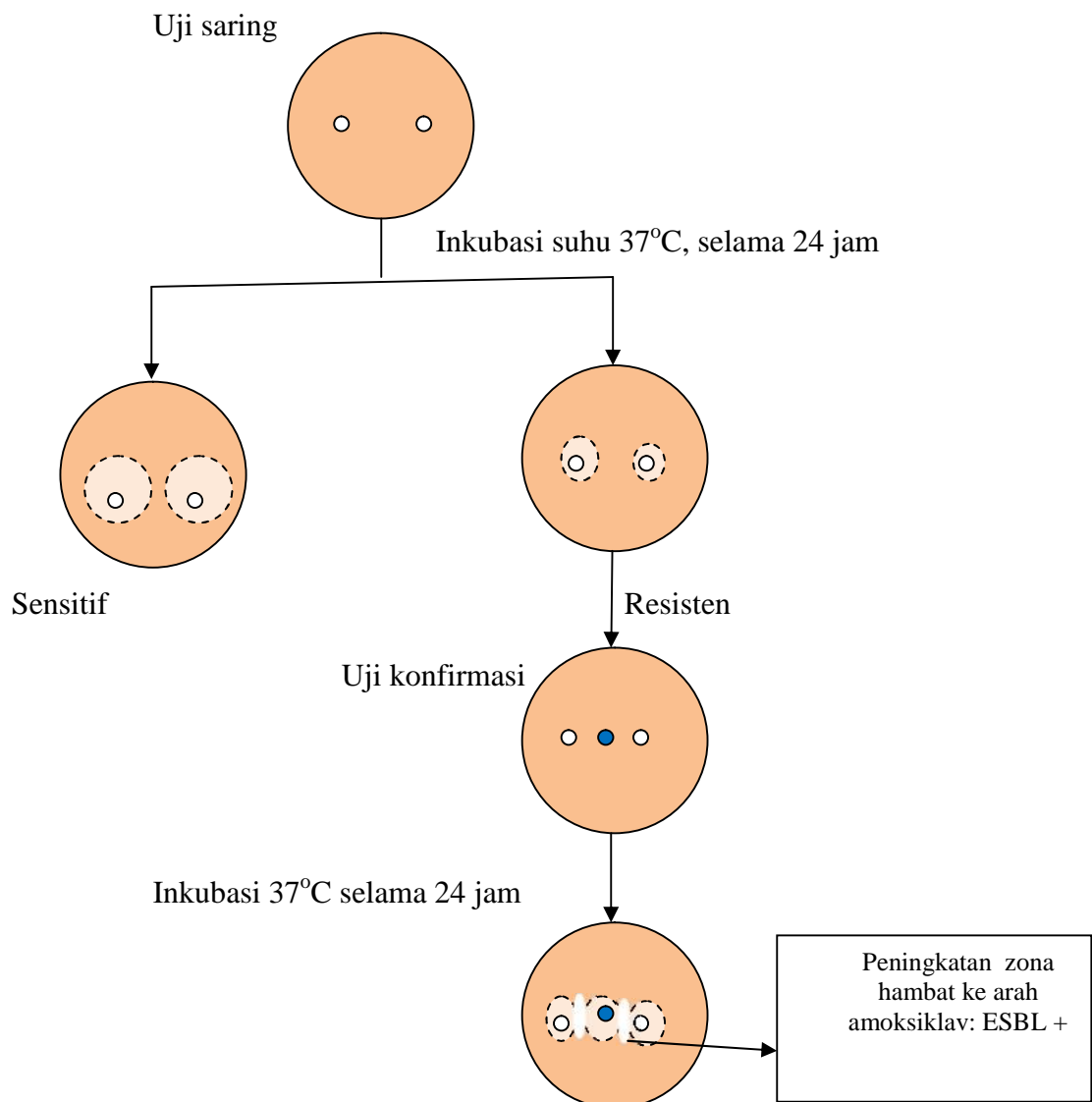
5. Uji Sensitifitas : uji saring dengan metode difusi Kirby Bauer.

- a) Suspensi bakteri yang telah disesuaikan dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5, diambil 100 μl dengan mikropipet dan dioleskan ke dalam media Muller Hinton secara merata dengan *hockey stick* dan didiamkan selama 5 menit agar bakteri meresap.
- b) Cakram antibiotika seftazidim 30 μg dan sefotaksim 30 μg ditempelkan pada media yang telah ditanami *Klebsiella pneumoniae*, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c) Setelah diinkubasi, diameter daerah bening yang terbentuk di sekitar cakram antibiotik diukur sebagai diameter daya hambat

antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri (Akujobi and Ewuru, 2010).

6. Uji konfirmasi dengan metode *Double Disk Synergy Test*

- a) Isolat bakteri yang intermediet atau resisten terhadap seftazidim atau sefotaksim disuspensikan kembali dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5, diambil 100 µl dengan mikropipet lalu dioleskan ke dalam media Muller Hinton secara merata dan didiamkan 5 menit agar bakteri meresap.
- b) Cakram antibiotika amoksislav 20/10 µg ditempelkan di tengah, seftazidim 30 µg dan sefotaksim µg di sebelah kiri dan kanan amoksislav dengan jarak tepi amoksislav ke sefotaksim dan seftazidim sekitar 15-20 mm, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam.
- c) Bakteri merupakan penghasil enzim ESBL jika terjadi peningkatan diameter zona hambat ke arah disk amoksislav (Akujobi and Ewuru, 2010).



- amoksilav 20/10 µg
- sefotaksim 30 µg , seftazidim 30 µg

Gambar 3. Prosedur Penelitian

E. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah seluruh pasien yang telah dilakukan kultur mikroorganisme di Rumah Sakit Umum Abdul Moeloek Bandar Lampung dan Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung.

2. Sampel Penelitian

Sampel adalah pasien yang pada isolat kliniknya ditemukan bakteri *Klebsiella pneumonia*.

F. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

Isolat klinik *Klebsiella pneumonia* yang intermediet atau resisten terhadap seftazidim atau sefotaksim.

Kriteria Eksklusi

Tidak ada kriteria eksklusi dalam penelitian ini.

G. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Klebsiella pneumonia yang intermediet atau resisten terhadap seftazidim atau sefotaksim.

2. Variabel terikat

Peningkatan zona hambat ke arah disk amoksiklav.

H. Definisi Operasional

1. *Klebsiella pneumonia* yang resisten terhadap seftazidim atau sefotaksim adalah *Klebsiella pneumonia* masih tetap tumbuh walaupun diberi seftazidim atau sefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap sefotaksim 14 mm dan seftazidim 14 mm.
2. *Klebsiella pneumonia* yang intermediet terhadap seftazidim atau sefotaksim adalah *Klebsiella pneumonia* masih dapat tumbuh tapi tidak dapat dibunuh oleh seftazidim atau sefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap sefotaksim 15-22 mm dan seftazidim 15-17 mm.
3. *Klebsiella pneumonia* yang sensitif terhadap seftazidim atau sefotaksim adalah *Klebsiella pneumonia* yang dapat dibunuh oleh seftazidim atau sefotaksim atau dengan diameter zona hambat terhadap sefotaksim 23 mm dan seftazidim 18 mm.
4. Keberadaan enzim ESBL positif adalah jika terjadi peningkatan zona hambat ke arah disk amoksiklav .