

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Ruang Lingkup Penelitian

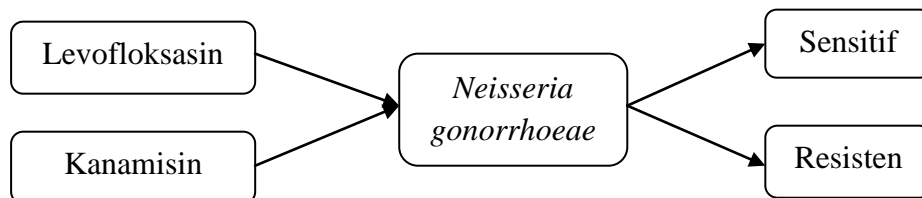
Penelitian ini adalah penelitian dalam bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin serta bagian Mikrobiologi.

#### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang dan Puskesmas Mangkang Semarang (Lokalisasi Gambilangu) pada bulan Desember 2015 sampai Mei 2016.

#### 3.3. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian analitik observasional dengan rancangan *cross sectional design*.



Gambar 9. Desain Penelitian

### **3.4. Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1. Populasi Target**

Populasi target penelitian ini adalah pasien dengan positif duh purulen.

#### **3.4.2. Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau penelitian ini adalah pasien dengan positif duh purulen di Puskesmas Mangkang Semarang (Lokalisasi Gambilangu) pada bulan Maret sampai Mei 2016.

#### **3.4.3. Sampel**

Sampel penelitian adalah pasien dengan positif duh purulen dan ditemukannya kuman *Neisseria gonorrhoeae* pada duh purulen di Puskesmas Mangkang Semarang (Lokalisasi Gambilangu), dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

##### **3.4.3.1. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi untuk penelitian ini adalah:

- Penderita dengan duh purulen yang ditemukan diplokokus gram negatif pada pengecatan gram, kultur dengan morfologi *N. gonorrhoeae*, tes oksidase positif, dan tes fermentasi glukosa positif
- Bersedia mengikuti penelitian ini dengan menandatangani *informed consent*.

### 3.4.3.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi untuk penelitian ini adalah :

- Kultur terkontaminasi dengan bakteri lain

### 3.4.4. Cara Sampling

Pemilihan subjek penelitian dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yakni berdasarkan kedatangan subjek penelitian ke klinik IMS Puskesmas Mangkang Semarang. Pasien yang sesuai dengan kriteria penelitian akan dipakai sebagai subjek penelitian. Pengambilan sampel dihentikan setelah jumlah sampel terpenuhi.

### 3.5. Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus uji hipotesis untuk 2 proporsi :

$$n1 = n2 = \frac{(Z\alpha \sqrt{2PQ} + Z\beta \sqrt{P1Q1 + P2Q2})^2}{(P1 - P2)^2}$$

$n1 = n2 =$  besar sampel

$Z\alpha =$  deviat baku normal untuk  $\alpha = 1,96$

$Z\beta =$  deviat baku normal untuk  $\beta = 0,842$

$P1 =$  proporsi sensitivitas antibiotik levofloksasin = 0,27

$P_2 = \text{proporsi sensitivitas antibiotik kanamisin} = 0,77$

$Q_1 = \text{perbedaan hasil klinis antibiotik levofloksasin} = 1 - P_1 = 0,73$

$Q_2 = \text{perbedaan hasil klinis antibiotik kanamisin} = 1 - P_2 = 0,23$

$P = \text{proporsi} = \frac{1}{2} (P_1 + P_2) = \frac{1}{2} (0,27 + 0,77) = \frac{1}{2} 1,04 = 0,52$

$Q = \text{perbedaan hasil klinis} = 1 - P = 1 - 0,52 = 0,48$

Metode perhitungan

$$\begin{aligned}
 n_1 = n_2 &= \frac{\left( 1,96 \sqrt{2 \cdot 0,52 \cdot 0,48} + 0,842 \sqrt{0,27 \cdot 0,73 + 0,77 \cdot 0,23} \right)^2}{(0,77 - 0,27)^2} \\
 &= \frac{\left( 1,96 \sqrt{0,4992} + 0,842 \sqrt{0,1971 + 0,1771} \right)^2}{0,5^2} \\
 &= \frac{\left( 1,96 \cdot 0,7 + 0,842 \sqrt{0,3742} \right)^2}{0,25} \\
 &= \frac{\left( 1,372 + 0,842 \cdot 0,61 \right)^2}{0,25} \\
 &= \frac{\left( 1,372 + 0,51 \right)^2}{0,25} \\
 &= \frac{1,882^2}{0,25} \\
 &= \frac{3,54}{0,25} \\
 &= 14
 \end{aligned}$$

Dari hasil perhitungan sampel, maka besar sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 14 sampel untuk 2 jenis antibiotik.

Keterangan :

P1 dan P2 didapatkan berdasarkan referensi :

- Yosse Rizal<sup>9</sup>

### **3.6. Variabel Penelitian**

#### **3.6.1. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sensitivitas bakteri *Neisseria gonorrhoeae*.

#### **3.6.2. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah antibiotik levofloksasin dan kanamisin.

### 3.7. Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No.	Variabel	Skala
1.	<p><b>Levofloksasin</b></p> <p>Antibiotik golongan fluorokuinolon yang memiliki cara kerja menghambat enzim DNA girase pada kuman dan bersifat bakterisidal.</p> <p>Pemeriksaan dengan menggunakan disk antibiotik merk Oxoid<sup>TM</sup> dengan konsentrasi 5 µg.</p>	Nominal
2.	<p><b>Kanamisin</b></p> <p>Antibiotik golongan aminoglikosida yang memiliki cara kerja menghambat sintesis protein dan bersifat bakterisidal.</p> <p>Pemeriksaan dengan menggunakan disk antibiotik merk Oxoid<sup>TM</sup> dengan konsentrasi 30 µg.</p>	Nominal
3.	<p><b>Sensitivitas bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i></b></p> <p>Menggunakan metode difusi, dengan mengukur diameter zona hambat sesuai antibiotik yang digunakan pada media Mueller Hinton – Thayer Martin.</p> <p>Levofloksasin :</p> <p>Sensitif bila diameter zona hambat <math>\geq 31</math> mm<sup>32</sup></p> <p>Resisten bila diameter zona hambat <math>&lt; 31</math> mm</p> <p>Kanamisin :</p> <p>Sensitif : diameter zona hambat <math>\geq 18</math> mm<sup>33</sup></p> <p>Resisten : diameter zona hambat <math>&lt; 18</math> mm</p>	Nominal

### 3.8. Cara Pengumpulan Data

#### 3.8.1. Bahan

- Duh tubuh penderita yang ditemukan bakteri diplokokus Gram negatif intraseluler pada pemeriksaan pengecatan Gram, tes oksidase positif, tes fermentasi glukosa positif, dan hasil kultur menunjukkan morfologi *Neisseria gonorrhoeae*.
- Media Thayer Martin, yang tersusun dari :
  - Mueller Hinton agar
  - 5% coklat agar dengan darah domba
  - Antibiotik (vankomisin, kolistin, nistatin, dan trimetropin) 10mL<sup>34</sup>
- Media Mueller Hinton – Thayer Martin Agar, yang tersusun dari :
  - Thayer Martin
  - *Beef infusion* 300 gram
  - *Acid hydrolysate of casein* 17,5 gram
  - Agar 17 gram
  - *Starch* (kanji) 1,5 gram<sup>34</sup>

- Media Mc Farland 0,5, yang tersusun dari :
  - Barium klorida 1% 0,05 ml
  - Asam sulfat 1% 9,95 gram
- Disk antibiotik levofloksasin
- Disk antibiotik kanamisin
- Reagen pengecatan Gram yang terdiri dari:
  - Gram A : Karbol Gentian Violet (cat utama)
  - Gram B : Lugol (mordan)
  - Gram C : Alkohol 96% (dekolorisator)
  - Gram D : Air Fusion (cat penutup)
- Reagen oksidase, yang tersusun dari :
  - *Dimethyl-para-phenyl-diamin-hydro-chlorid* 1 gram
  - Aquades 100 ml
- Media *Cystine Trypticase Agar* (CTA)
  - Karbohidrat (glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa)
  - *Phenol red*
  - Sistein dan pepton<sup>35</sup>



### 3.8.2. Alat

- Lidi kapas steril
- Spekulum
- Osse
- Lampu spiritus
- Objek glass
- Tabung reaksi
- Mikroskop
- Pipet
- Pinset
- Cawan petri
- Tempat preparat

### 3.8.3. Jenis Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian yaitu sensitif atau resistennya antibiotik levofloksasin dan kanamisin terhadap kuman *Neisseria gonorrhoeae* pada media Mueller Hinton-Thayer Martin.

### 3.8.4. Cara Kerja

#### 3.8.4.1. Cara Pengambilan Duh Endoserviks pada Wanita

1. Beri penjelasan lebih dulu mengenai pemeriksaan yang akan dilakukan agar pasien tidak merasa takut.
2. Bersihkan terlebih dahulu dengan kain kasa yang telah dibasahi larutan NaCl.
3. Setiap pengambilan bahan harus menggunakan spekulum steril (sesuaikan ukuran spekulum dengan riwayat kelahiran *per vaginam*), swab, atau sengkeli steril.
4. Masukkan daun spekulum steril dalam keadaan tertutup dengan posisi tegak / vertikal ke dalam vagina, dan setelah seluruhnya masuk kemudian putar pelan-pelan sampai daun spekulum dalam posisi datar / horizontal. Buka spekulum dan dengan bantuan lampu sorot vagina cari serviks. Kunci spekulum pada posisi tersebut sehingga serviks terfiksasi.
5. Bersihkan daerah endoserviks dengan kasa steril, kemudian ambil spesimen duh tubuh serviks dengan sengkeli / swab Dacron<sup>TM</sup> steril untuk pembuatan sediaan hapus, dengan swab Dacron<sup>TM</sup> yang lain dibuat sediaan biakan.

6. Lepas spekulum dengan cara kunci spekulum dilepaskan sehingga spekulum dalam posisi tertutup, putar spekulum  $90^\circ$  sehingga daun spekulum dalam posisi tegak, dan keluarkan spekulum perlahan-lahan.<sup>6</sup>

#### **3.8.4.2. Cara Pengecatan Gram**

1. Oleskan sekret pada objek glass, fiksasi.
2. Setelah terfiksasi, genangi objek glass dengan Gram A dan biarkan selama 60 detik, kemudian bilas dengan air mengalir.
3. Genangi objek glass dengan Gram B selama 60 detik, kemudian bilas dengan air mengalir.
4. Bilas kembali dengan air mengalir untuk menghilangkan Gram B, kemudian genangi objek glass dengan Gram C selama 30 detik, kemudian bilas dengan air mengalir.
5. Genangi dengan Gram D selama 2 menit, kemudian bilas dengan air mengalir sampai Gram D hilang, kemudian dikeringkan dengan tisu.
6. Setelah kering, tetesi dengan minyak emersi pada lapangan pandang yang ingin dilihat, kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa 10x100 dengan pembesaran 1000x.
7. Apabila positif akan ditemukan diplokokus gram negatif intrasel dan ekstrasel.<sup>36</sup>

#### **3.8.4.3. Cara Pemeriksaan Kultur**

1. Duh tubuh yang telah ditemukan kuman diplokokus gram negatif dikultur dengan menggunakan media Thayer Martin agar, dibiakan selama 18-24 jam pada suhu kamar (37°C).
2. Lakukan pengecekan koloni dengan ciri-ciri translusen, tidak berpigmen, dengan ukuran 0,5 – 1 mm.
3. Ambil koloni untuk tes oksidase dan tes fermentasi.
4. Bila tes tersebut positif, lakukan sub-kultur pada media Thayer Martin.<sup>37</sup>

#### **3.8.4.4. Cara Pemeriksaan Oksidase**

1. Siapkan reagen tes oksidase yang berbentuk kertas.
2. Ambil koloni bakteri yang sudah tumbuh dengan menggunakan ose, lalu teteskan ke reagen kertas yang telah tersedia.
3. Tunggu beberapa menit. Hasil tes oksidase positif jika timbul warna biru / ungu tua pada reagen yang telah ditambahkan bakteri. Hasil tes oksidase negatif jika reagen tetap bening setelah ditambah bakteri.

#### 3.8.4.5. Cara Pemeriksaan Fermentasi

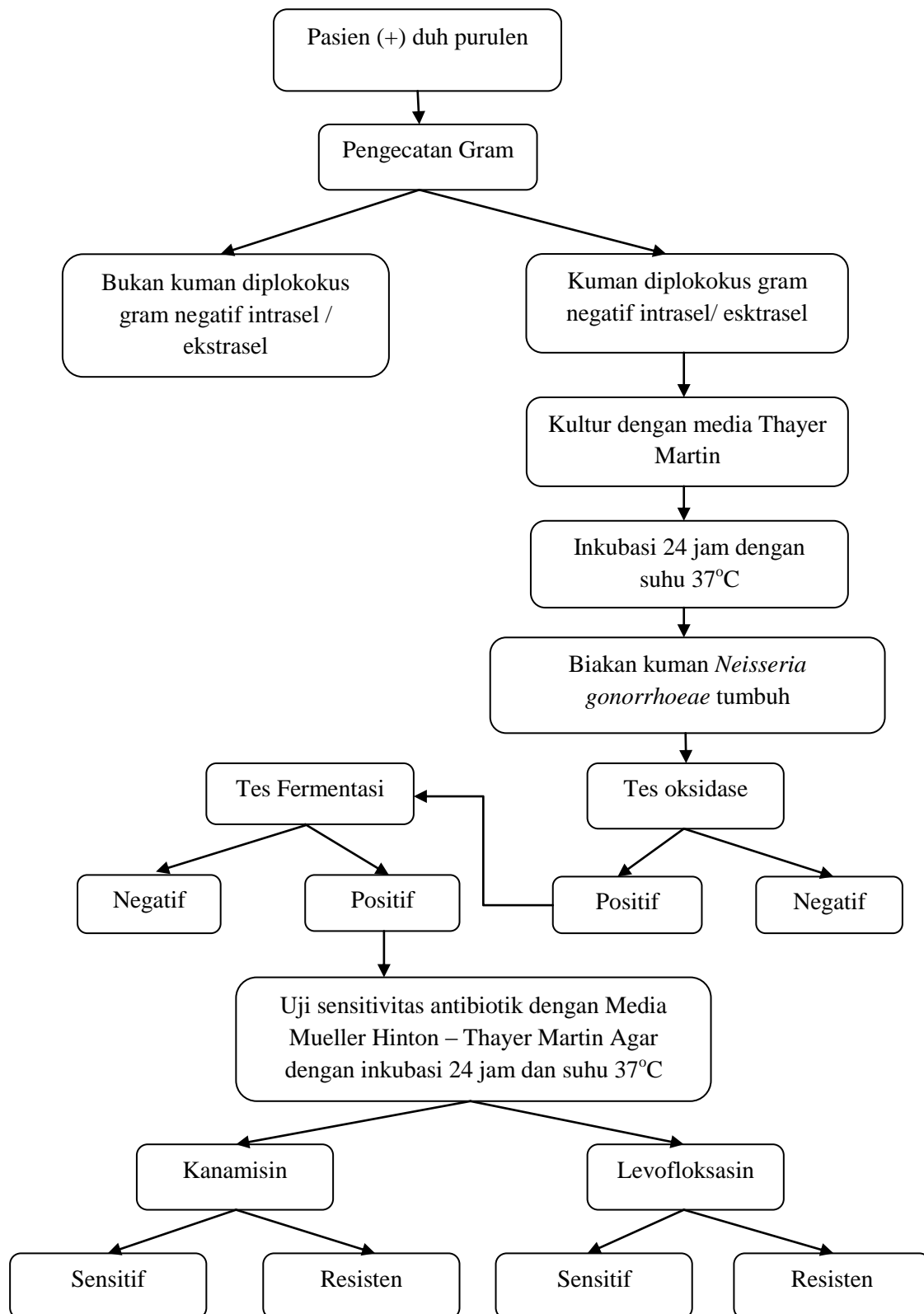
1. Masukkan media ke dalam tabung reaksi.
2. Ambil 1 osse steril biakan dari koloni pada media Thayer Martin.
3. Masukkan osse ke dalam tabung yang berisi glukosa, kosok hingga bakteri terlepas dari osse.
4. Osse disterilkan kembali dan ambil bakteri dari koloni yang sama, masukkan ke dalam tabung yang berisi glukosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa.
5. Inkubasikan pada inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

#### 3.8.4.6. Uji Sensitivitas Antibiotik

1. Setelah tumbuh koloni dan positif tes oksidase serta tes fermentasi glukosa, koloni dari hasil sub-kultur tersebut diambil dengan menggunakan osse kemudian sesuaikan densitas dari suspensi kuman yang telah disesuaikan dengan densitas dari standard Mc Farland 0,5.
2. Dalam waktu 15 menit setelah penyesuaian suspense bakteri, masukan *cotton swab* ke dalam suspensi. Lalu putar swab pada dinding media dan men-*streak* permukaan media Mueller Hinton-Thayer Martin agar.
3. Swab permukaan sebanyak 3 kali, masing-masing putaran media 60°.

4. Lakukan inokulasi 3-5 menit, tetapi tidak lebih dari 15 menit sampai mengering.
5. Masukkan disk antibiotik pada permukaan agar. Jangan pindahkan disk setelah menyentuh permukaan agar.
6. Setelah diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C, melakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan penggaris. Diameter dapat diukur dari permukaan media ataupun dari dasar media.<sup>37</sup>

### 3.9. Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian

### 3.10 Analisis Data

Data yang terkumpul diperiksa kelengkapan dan kebenarannya, selanjutnya dianalisis menggunakan program komputer. Pengujian statistik yang dilakukan adalah uji beda dengan analisa data yang digunakan meliputi analisa deskriptif dan uji hipotesis menggunakan *chi square* ( uji  $x^2$  ) dengan derajat kemaknaan  $p < 0,05$  atau dengan uji alternatif yaitu *fisher's exact test*.

### 3.11 Etika Penelitian

*Ethical Clearance* telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atau RS Nasional Diponegoro Semarang. Persetujuan penelitian diberikan dalam bentuk *informed consent* tertulis. Subjek penderita atau calon subjek penelitian telah diberi penjelasan tentang tujuan, manfaat, dan prosedur penelitian. Penderita berhak menolak untuk diikutsertakan pada penelitian. Penderita yang menolak tetap mendapat pengelolaan dan penanganan sesuai dengan protap gonore. Identitas subjek penelitian telah dirahasiakan dan tidak dipublikasikan tanpa seijin subjek penelitian. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian telah ditanggung oleh peneliti.