

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Ruang Lingkup Penelitian

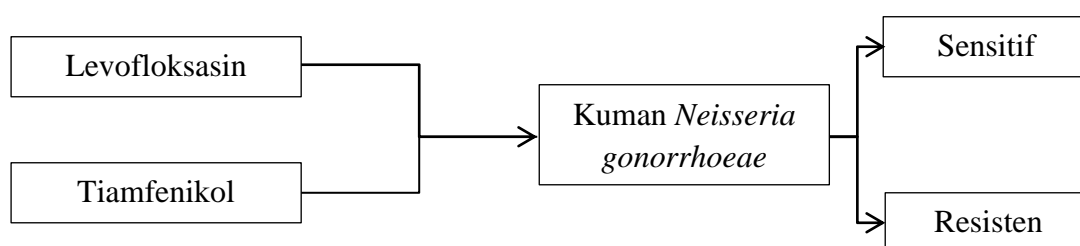
Penelitian ini merupakan penelitian dalam bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin dan Mikrobiologi.

#### 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 sampai dengan Juli 2016.

#### 3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan oleh peneliti 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 adalah pasien dengan positif duh purulen.

#### **3.4.2 Populasi Terjangkau**

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

#### **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 penelitian ini adalah:

- Pasien dengan positif duh purulen dan ditemukannya kuman diplokokus gram negatif pada pengecatan gram, hasil kultur yang menunjukkan morfologi kuman *Neisseria species*, tes oksidase positif (+), dan tes fermentasi glukosa positif (+)
- Bersedia mengikuti penelitian ini, dengan menandatangani *informed consent*

### 3.4.3.1 Kriteria Eksklusi

- Kultur terkontaminasi kuman lain.

### 3.4.4 Cara Sampling

Pemilihan subyek penelitian dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yakni berdasarkan kedatangan subyek penelitian di klinik Lokalisasi Gambilangu, Puskesmas Mangkang Semarang. Pasien yang sesuai dengan kriteria penelitian akan dipakai sebagai subyek penelitian. Pengambilan sampel dihentikan setelah jumlah sampel terpenuhi.

### 3.5 Besar Sampel

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

$$n_1 = n_2 = \frac{(Z\alpha \sqrt{2PQ} + Z\beta \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$n_1 = n_2 =$  Besar sampel

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

$Z\beta =$  Deviat normal untuk  $\beta = 0,842$

$$P = \text{Proporsi} = \frac{1}{2} (P_1 + P_2) = 0,66$$

$$Q = \text{Perbedaan hasil klinis} = 1 - P = 0,34$$

$$P1 = \text{Proporsi sensitivitas antibiotik levofloksasin} = 0,34$$

$$P2 = \text{Proporsi sensitivitas antibiotik tiamfenikol} = 0,98$$

$$Q1 = \text{Perbedaan hasil klinis antibiotik levofloksasin} = 1 - P1 = 0,66$$

$$Q2 = \text{Perbedaan hasil klinis antibiotik tiamfenikol} = 1 - P2 = 0,02$$

Metode perhitungan:

$$\begin{aligned} n1 = n2 &= \frac{(1,96 \sqrt{2 \times 0,66 \times 0,34} + 0,842 \sqrt{0,34 \times 0,66 + 0,98 \times 0,02})^2}{(0,34 - 0,98)^2} \\ &= \frac{(1,96 \sqrt{0,4488} + 0,842 \sqrt{0,22 + 0,02})^2}{(0,64)^2} \\ &= \frac{(1,96 \times 0,7 + 0,842 \times 0,5)^2}{0,4096} \\ &= \frac{(1,37 + 0,42)^2}{0,4096} \\ &= \frac{(1,79)^2}{0,4096} \\ &= 7,8 = 8 \end{aligned}$$

Dari hasil perhitungan sampel maka besar sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 8 sampel untuk 2 jenis antibiotik.

Untuk kemungkinan *drop out*, disiapkan cadangan sampel sebanyak 10% dari jumlah sampel sehingga didapatkan besar sampel sebanyak 8,78 untuk 2 jenis antibiotik yang dibulatkan menjadi 9 sampel.

Keterangan:

P1 didapatkan berdasar referensi:

- Shigemura, Okada, Shirakawa, Tanaka, Arakawa, Kinoshita (2003)<sup>41</sup>

P2 didapatkan berdasar referensi:

- Yeva Rosana, Agus Sjahrurchman, Endang Sedjaningsih, Sumaryati Arjoso, Ika Ningsih, Jubianto Judarnanso (2006)<sup>42</sup>

### **3.6 Variabel Penelitian**

#### **3.6.1 Variabel Terikat**

Variabel terikat adalah sensitivitas kuman *Neisseria gonorrhoeae*

#### **3.6.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas adalah antibiotik levofloksasin dan tiamfenikol.

### 3.7 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No.	Variabel	Skala
1.	<p><b>Levofloksasin</b></p> <p>Antibiotik golongan fluorokuinolon generasi ketiga yang bersifat bakterisidal dengan memblok sintesis DNA.</p> <p>Sediaan antibiotik yang digunakan untuk gonore adalah 500 mg, dosis tunggal dan peroral.</p> <p>Pemeriksaan uji sensitivitas menggunakan disk merek oxoid dengan dosis 5 µg</p>	Nominal
2.	<p><b>Tiamfenikol</b></p> <p>Antibiotik bersifat bakteriostatik dengan menghambat sintesis protein kuman.</p> <p>Sediaan antibiotik yang digunakan untuk gonore adalah 3,5g, dosis tunggal, dan diberikan secara per oral.</p> <p>Pemeriksaan uji sensitivitas menggunakan kertas saring yang mengandung tiamfenikol 30 µg</p>	Nominal
3.	<p><b>Sensitivitas <i>Neisseria gonorrhoeae</i></b></p> <p>Menggunakan metode difusi dengan mengukur diameter (d) zona hambat pada media Mueller Hinton- Thayer Martin.</p> <p>Diameter zona hambat levofloksasin:<sup>43</sup></p> <p>Sensitif : diameter zona hambat <math>\geq 31</math> mm</p> <p>Resisten : diameter zona hambat <math>&lt; 31</math> mm</p> <p>Diameter zona hambat tiamfenikol:<sup>33</sup></p> <p>Sensitif : diameter zona hambat <math>\geq 18</math>mm</p> <p>Resisten : diameter zona hambat <math>&lt; 18</math>mm</p>	Nominal

### 3.8 Cara Pengumpulan Data

#### 3.8.1 Bahan

1. Pasien dengan positif duh purulen dan ditemukannya kuman diplokokus gram negatif intraseluler pada pengecatan gram, hasil kultur yang menunjukkan morfologi kuman *Neisseria species*, tes oksidase positif (+), dan tes fermentasi glukosa positif (+)
2. Reagen pengecatan Gram:
  - Gram A: Kristal Violet (cat utama)
  - Gram B: Lugol (mordan)
  - Gram C: Alkohol 96% (dekolorisator)
  - Gram D: Air fusion (cat penutup).<sup>44</sup>
3. Media Thayer Martin:
  - Mueller hinton agar
  - 5% coklat agar dengan darah domba
  - Antibiotik (vankomisin, kolistin, nistatin, dan trimetropin) 10mL.<sup>45</sup>
4. Media Mueller Hinton- Thayer Martin Agar:
  - Thayer Martin
  - *Beef infusion* 300gram
  - *Acid hydrolysate of casein* 17,5gram
  - Agar 17gram

- *Starch* (kanji) 1,5gram.<sup>45</sup>
5. Media Mc Farland 0,5:
    - Barium klorida 1% 0,05mL
    - Asam sulfat 1% 9,95gram
  6. Disk antibiotik levofloksasin
  7. Kapsul tiamfenikol
  8. Reagen tes oksidase:
    - Dimethyl- para- phenyl diamin- hydro chlorid 1gram
    - Aquades 100mL
  9. Media *Cystine Trypticase Agar* (CTA):
    - Karbohidrat (glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa)
    - *Phenol red*
    - Sistein dan pepton.<sup>46</sup>

### 3.8.2 Alat

1. Lidi kapas steril
2. Spekulum
3. Osse
4. Lampu spiritus
5. *Object glass*
6. Mikroskop
7. Pipet
8. Pinset



9. Cawan petri
10. Kertas saring
11. Tabung reaksi
12. Kotak *object glass*

### **3.8.3 Jenis Data**

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

### **3.8.4 Cara Kerja**

#### **3.8.4.1 Cara Pengambilan Sekret:**

1. Jelaskan kepada penderita tentang tindakan yang akan dilakukan. Pasien wanita, dibaringkan di meja ginekologi dalam posisi litotomi.
2. Cuci tangan dan gunakan sarung tangan serta alat pelindung diri sebelum memulai tindakan.
3. Ambil spekulum cocor bebek steril dengan tangan kanan, tangan kiri membuka labia mayora lalu memasukan spekulum dalam kondisi tertutup dan tegak ke dalam vagina.
4. Masukan spekulum perlahan dan sampai ujung lalu putar perlahan sambil membuka spekulum sampai posisi mendatar.
5. Ambil 2 lidi kapas steril untuk pengambilan sekret yang digunakan untuk pengecatan gram dan dimasukan ke dalam media transport Thayer Martin. Bersihkan terlebih dahulu ektooservik lalu dengan lidi kapas yang berbeda

swab bagian endoservik dengan panjang kira-kira 1-2cm dan diputar selama 10 detik.<sup>15</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>44</sup>

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

1. Duh purulen 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 koloni kuman berbentuk cembung, permukaanya mengkilat, berdiameter 0,5-1,0 mm, dan tidak berpigmen.
3. Ambil koloni untuk tes oksidase dan tes fermentasi, bila tes tersebut positif lakukan sub-kultur pada media Thayer-Martin, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

#### **3.8.4.4 Cara Tes Oksidase**

1. Siapkan reagen tes oksidase yang berbentuk kertas.
2. Ambil koloni kuman yang sudah tumbuh pada media Thayer-Martin dengan menggunakan osse, 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 Tes Fermentasi**

1. Masukkan media ke dalam tabung reaksi
2. Ambil 1 osse steril biakan dari koloni terpisah (koloni yang sama) pada media Thayer Martin
3. Masukkan osse ke dalam tabung yang berisi glukosa, kocok hingga bakteri terlepas dari osse.

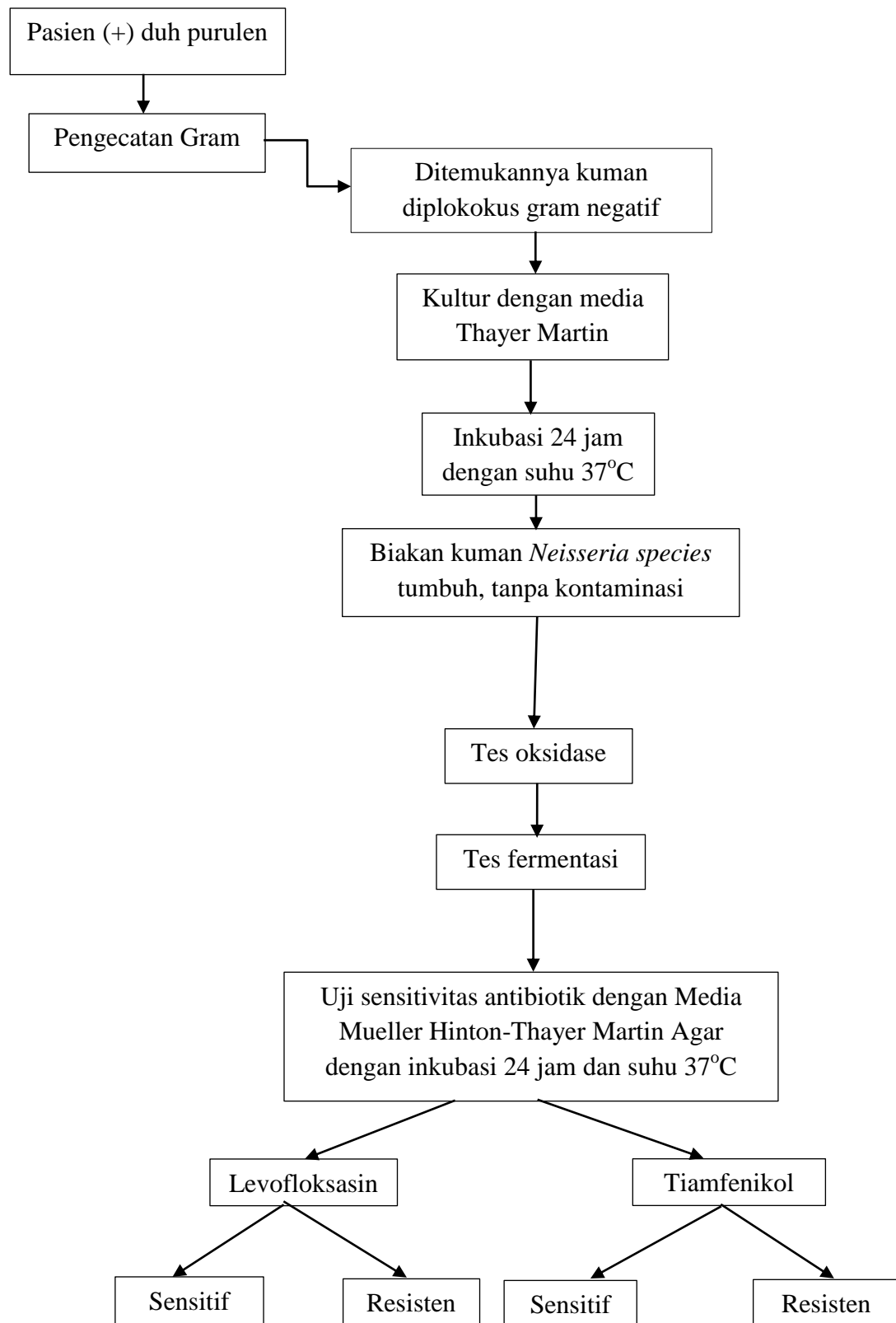
4. Osse disterilkan kembali dan diambil bakteri dari koloni yang sama, dimasukkan ke dalam tabung yang berisi glukosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa.
5. Inkubasikan pada inkubator selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C.

#### **3.8.4.6 Uji Sensitivitas Antibiotik**

1. Setelah tumbuh koloni dan positif oksidase serta 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 menstreak 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. Ambil beberapa swab dan letakkan pada objek glass untuk pemeriksaan oksidase dan fermentasi.
6. Letakan disk antibiotik levofloksasin dan kertas saring yang mengandung tiamfenikol pada permukaan agar. Tidak boleh memindahkan disk dan kertas saring setelah menyentuh permukaan agar.

7. 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>47</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. Analisa data dalam penelitian ini meliputi analisa deskriptif dan uji hipotesis menggunakan *chi square* (uji  $x^2$ ) dengan derajat kemaknaan  $p < 0,05$  atau dengan uji alternatif yaitu *fisher exact test*.

### 3.11 Etika Penelitian

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