
BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Bentuk desain penelitian yang akan digunakan adalah bentuk deskriptif *cross sectional* untuk mengetahui perbandingan antara hasil BTA dan kultur positif serta pola sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis* terhadap streptomisin.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada bulan September 2007 - Desember 2007.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi target dalam penelitian ini adalah pasien TB di Indonesia. Populasi terjangkau adalah pasien TB yang diperiksa pada Departemen Mikrobiologi FKUI pada periode September 2005 hingga Desember 2007. Sampel akan diambil dari semua populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4 Kriteria Inklusi

- Semua spesimen dari pemeriksaan sputum dan pus yang diperiksa di Departemen Mikrobiologi FKUI pada periode September 2005 – Desember 2007
- Semua spesimen dengan kultur positif yang dilanjutkan dengan uji sensitivitas antibiotik

3.5 Kriteria Eksklusi

- Spesimen dari pasien dengan informasi laboratorium yang tidak lengkap

3.6 Besar Sampel

Besar sampel (n) dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$n = \frac{Z\alpha^2 \times p \times q}{d^2}$$

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

p = proporsi = 0,33

q = 1 – p = 0,67

d = ketepatan absolut yang dikehendaki = 0,1

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,33 \times 0,67}{(0,1)^2} = 84,94 \approx 85$$

Jadi, sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 85 pasien dengan hasil kultur positif dan dilakukan uji sensitivitas. Namun yang peneliti ambil adalah semua data yang memenuhi kriteria inklusi.

3.7 Definisi Operasional

1. Sensitif: jumlah koloni pada media berisi obat tidak ada atau kurang dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol (suspensi bakteri 10^{-5} mg/ml)
2. Resisten: jumlah koloni pada media berisi obat sama atau lebih dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol (suspensi bakteri 10^{-5} mg/ml)
3. Sputum: bahan yang dikeluarkan dari bronkus dan paru yang dalam hal ini kemungkinan mengandung BTA
4. Pus: cairan hasil proses peradangan yang terbentuk dari sel darah putih (leukosit) dan cairan encer yang sering disebut nanah
5. Kasus TB pasti (definitif): pasien dengan biakan positif untuk *Mycobacterium tuberculosis* atau tidak ada fasilitas biakan, sekurang-kurangnya 2 dari 3 spesimen dahak SPS hasilnya BTA positif¹
6. Informasi laboratorium yang tidak lengkap: ada bagian dari data yang tidak berisi informasi mengenai jenis kelamin, rumah sakit,

bahan, hasil BTA (homogenisasi dan non-homogenisasi), kultur, atau hasil uji sensitivitas

7. Resistensi primer: resistensi yang terjadi tanpa adanya pengobatan tuberkulosis sebelumnya dan disebabkan oleh infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang sudah resistensi terhadap obat tuberkulosis tertentu.²¹
8. Resistensi sekunder: resistensi oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang pada mulanya sensitif namun menjadi resisten akibat penggunaan OAT yang tidak tepat.²¹

3.8 Cara Kerja

3.8.1 Sputum dan Pus:^{1,23,24}

Diperlukan tiga kali pengambilan sputum dan dua kali kunjungan, yaitu: sputum sewaktu, sputum pagi, dan sputum sewaktu.

Adapun sampel pus adalah sampel yang diantar langsung dari lembaga pengirim dan pengambilan sampel tidak dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUI.

3.8.2 Peralatan:

Wadah sputum steril yang bermulut besar terbuat dari plastik sekali pakai, tahan bocor, tidak mudah pecah dan bertutup ulir.

3.8.3 Prosedur Pengambilan²³

- pot / wadah sputum diberikan kepada pasien
- diberikan penjelasan kepada pasien cara membatukkan sputum yang baik
- wadah sputum ditaruh di dekat bibir pasien, sputum dimasukkan kedalamnya
- sputum yang baik adalah yang kental dan jumlahnya cukup 2-3mL
- diberikan lagi wadah sputum untuk menampung sputum pagi di rumah

- setelah menerima sputum dari pasien, wadah diberi identitas dan dilabel.

3.8.4 Cara Penyimpanan

Sputum harus dikirim ke laboratorium secepat mungkin setelah pengambilan. Apabila tidak memungkinkan, sputum disimpan pada suhu 2-8°C, jangan lebih dari satu malam.

3.8.5 Prosedur Pemeriksaan Mikroskopik

Cara membuat apusan:

1. sputum diambil, pilih bagian yang purulen
2. dibuat apusan spiral dengan rata berukuran 2 x 3 cm
3. ketebalan: tidak terlalu tebal, tidak terlalu tipis.
4. dibiarkan kering di udara selama 15-30 menit

Cara pewarnaan *Ziehl-Neelsen*:²³

1. sediaan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api sebanyak tiga kali
2. kaca benda ditaruh di atas rak pewarnaan
3. *carbol fuchsin* dituangkan di atasnya sampai menutupi seluruh permukaan kaca benda
4. dari bawah dipanasi sampai keluar uap (jangan sampai mendidih) selama lima menit
5. dibiarkan dingin selama 5 - 7 menit
6. dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kelebihan *carbol fuchsin*.
7. dilakukan dekolorisasi dengan menuangkan asam alkohol 3% sampai sediaan menjadi pucat
8. dicuci dengan air mengalir
9. dituangkan *methylen blue* 1%, biarkan selama 10-20 detik
10. dicuci dengan air mengalir dan biarkan kering di udara

Untuk pembacaan gunakan pembesaran 1000 X dengan minyak emersi. BTA tampak sebagai batang berwarna merah yang halus, sedikit

melengkung, tersendiri, berpasangan atau dalam kelompok dan nyata sekali dengan latar belakang berwarna biru. Pembacaan dilakukan sebanyak 100 lapang pandang.

Pencatatan hasil pembacaan mikroskopik berdasarkan skala *International Union against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD):^{1,5,23}

1. Tidak ditemukan BTA/ 100 lp: negatif
2. Ditemukan 1-9 BTA/ 100 lp: ditulis jumlah BTA nya
3. Ditemukan 9-99 BTA/ 100 lp: positif 1
4. Ditemukan 1-10 BTA/ lp: positif 2
5. Ditemukan >10 BTA / lp: positif 3
6. Diagnosis dipastikan jika hasil pemeriksaan sputum 2 kali BTA positif dari 3 spesimen yang diperiksa.

3.8.6 Prosedur Kultur *Mycobacterium tuberculosis*

Homogenisasi/ konsentrasi sputum:

Sebelum dilakukan pewarnaan, spesimen dihomogenisasi terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi spesimen.^{15,24} Tujuan homogenisasi sputum sebelum ditanam adalah untuk membuat homogen sputum, membunuh mikroorganisme lain selain *Mycobacterium tuberculosis*, memperbaiki hasil pemeriksaan mikroskopik. Hasil yang terbaik adalah dengan cara Kubiica menggunakan NaOH 4%.²³ Bahan yang tidak dapat dikerjakan segera, sebaiknya dihomogenisasi dengan TSP 10%. Bahan pus harus disentrifugasi dahulu selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

Langkah-langkah isolasi:²³

1. spesimen yang sudah diolah dipipet 0,1 mL kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung *Lowenstein-Jensen*
2. diratakan pada permukaan media dengan cara memutar-mutar tabung
3. tabung diletakkan secara horizontal pada rak miring dengan tutup dilonggarkan, simpan 2 tabung dalam inkubator dengan suhu 37°C

dan satu tabung lagi diinkubasi pada suhu kamar (25-27° C) selama 2-3 hari

4. inkubasi dilanjutkan 6-8 minggu dengan tabung dalam posisi tegak dan tutup tabung dikencangkan^{15,24}
5. pertumbuhan koloni diamati setiap minggu. Diamati tingkat pertumbuhan, tipe koloni, dan pigmentasi

Pembacaan hasil dan interpretasi kultur:

- Setiap minggu dibaca, bila ada pertumbuhan koloni dicatat tanggalnya dan dihitung jumlah koloninya
- dibuat sediaan dari koloni yang tumbuh lalu dilakukan pewarnaan *Ziehl-Neelsen*
- koloni tersangka: berwarna kuning, permukaannya kering dan rapuh, bagian tepi/ pinggir tidak rata
- hasil dinyatakan negatif bila tidak ada pertumbuhan dalam 8 minggu

Pencatatan dan pelaporan kultur

KOLONI	PELAPORAN
Tidak tumbuh	0
Kontaminasi	Y
1 - 5 koloni	Tulis jumlahnya
6-24 koloni	6
25 - 100 koloni	7
>100 koloni	8
Koloni menyeluruh	9

3.8.7 Prosedur Uji Sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis*

3.8.7.1 Alat dan Bahan²³

- | | |
|--|---|
| <p>A. Persiapan larutan obat</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aquades • Obat anti tuberkulosis • Propylene glycerol • Penangas air • Rak tabung | <ul style="list-style-type: none"> • Tabung reaksi <p>B. Persiapan media mengandung obat</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gelas ukur • Inspisator • Labu erlenmeyer |
|--|---|

- Media *Lowenstein-Jensen*
 - Tabung reaksi
 - Wadah es
- C. Persiapan suspensi kuman
- Aquades
 - Es
 - Gelas untuk mencampur
 - Pipet tetes
 - Sengkelit
- D. Inokulasi
- Media *Lowenstein-Jensen* mengandung obat
 - Media *Lowenstein-Jensen* tidak mengandung obat
 - Pipet tetes

3.8.7.2 Persiapan Larutan Obat

Obat yang digunakan harus berkadar murni, berbeda dengan obat yang digunakan di klinik yang berupa campuran. Jangan menggunakan tablet atau kapsul. Kebanyakan antibiotik tidak berkadar murni.²⁵⁻²⁷ Misalnya, berat 1 mg streptomisin (SM) adalah sama dengan potensi 780 µg, sehingga konsentrasinya harus dibandingkan dengan potensi masing-masing obat, bukan berdasarkan berat obat dari pabrik.

Cara pembuatan larutan stok dari setiap obat:²³

- Streptomisin (SM): 1 gr potensi SM + 4,3 ml aquades = 200 mg/ml atau 200.000 µg/ml.
- Isoniazid (INH): 50 mg INH + 10 ml aquades = 5 mg/ml = 5.000 µg/ml
- Rifampisin: 50 mg RFP + 5 ml *propylene glycerol* = 10 mg/ml = 10.000 µg/ml (sambil dipanaskan dalam penangas air)

3.8.7.3 Persiapan Media Mengandung Obat

Larutan obat dan media harus disiapkan pada hari yang sama. Lebih baik menyiapkan media sesaat sebelum memulai pemeriksaan. Jika hal itu tidak memungkinkan, media tersebut harus disimpan di lemari es pada suhu 5°C. Uji sensitivitas dapat dilakukan pada medium *Lowenstein-Jensen*.^{26,27}

3.8.7.4 Prosedur Perneriksaan²³

1. disediakan 800 ml media *Lowenstein-Jensen* dan dibagikan ke dalam delapan kelompok, masing-masing 100 ml. Satu dari delapan media itu tetap dibiarkan bebas dari larutan obat
2. media *Lowenstein-Jensen* yang bebas larutan obat dibagi ke dalam tabung, masing-masing 6 ml
3. larutan obat ditambahkan ke dalam 7 media lainnya dengan proporsi 1 ml berbanding 100 ml dan diaduk perlahan-lahan
4. media yang mengandung obat dibagi ke dalam tabung masing-masing 6 ml
5. dietakkan pada posisi miring, kemudian media dibuat menjadi padat dengan cara diinspasi pada suhu 90°C selama 1 jam
6. tabung-tabung yang berisi media yang sudah jadi dalam kantong plastik diikat rapat-rapat, lalu disimpan di lemari es jika tidak digunakan pada hari yang sama

3.8.7.5 Pembuatan Suspensi Kuman

Pastikan bahwa pertumbuhan itu tidak tercemar oleh bakteri lain. Biakan asli pada setiap kasus harus disimpan pada lemari es sampai hasil uji diperoleh. Penghancuran dan pencampuran kuman dilakukan dalam suasana dingin.

Prosedur:²³

1. pembuatan suspensi 1mg/ml
 - 1 -2 tetes NaCl 0,85% + 1 sengkeli koloni berdiameter 1mm
 - dicampur sampai homogen dengan menggunakan vortex, rendam dalam air es
 - ditambahkan NaCl sampai kekeruhannya sama dengan Mc.Farland no.1

2. dibuat pengenceran bakteri 10^{-3} dan 10^{-5}

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1 mg/ml suspensi bakteri	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl fisiologis steril	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

3. penanaman suspensi bakteri pada media kontrol dan media berisi obat-obatan

Suspensi Bakteri	Kontrol	RFP	SM	INH	PRZ	EB
10^{-3} mg ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10^{-5} mg/ml	0,1	-	-	-	-	-

3.8.7.6 Pembacaan dan Interpretasi Hasil²³

- Pembacaan dilakukan setelah masa inkubasi 4-6 minggu. Dimana pada kontrol 10^{-3} lebih dari 500 koloni (separuh media tertutup oleh koloni yang terisolir, 200 - 500 koloni)
- Jika jumlah koloni pada media berisi obat sama atau lebih dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol 10^{-5} maka dinyatakan resisten.
- Jika jumlah koloni pada media berisi obat tidak ada atau kurang dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol 10^{-5} maka dinyatakan sensitif.

3.8.7.7 Pencatatan dan Pelaporan

Setelah hasil pemeriksaan uji sensitivitas selesai, dicatat dalam buku register dan dilaporkan pada pengirim dalam formulir hasil pemeriksaan. Laboratorium harus melaporkan kepada dokter mengenai jumlah pertumbuhan di atas media mengandung obat dibandingkan dengan jumlah pertumbuhan pada media kontrol bebas obat, tanpa diagnosis resisten atau sensitif. Interpretasi semacam itu, maupun keputusan untuk melanjutkan atau menghentikan terapi dengan obat tertentu, hanya dilakukan oleh dokter.²³

3.9 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data sekunder yang diperoleh akan diolah dengan menggunakan program spss 11.7.

3.10 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.

