

BAB III

METODOLOGI

3.1 Desain Penelitian

Bentuk desain penelitian yang akan digunakan adalah bentuk deskriptif *cross sectional* untuk mengetahui pola sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Etambutol menurut jenis kelamin.

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 data dari pemeriksaan sputum dan pus yang diperiksa di Departemen Mikrobiologi FKUI pada periode September 2005 – Desember 2007
- Semua sampel dengan kultur positif yang dilanjutkan dengan uji sensitivitas antibiotik
- Sampel dengan indentias jenis kelamin

3.5 Kriteria Eksklusi

- Spesimen pasien dengan informasi laboratorium yang tidak lengkap
- Spesimen pasien yang tidak memenuhi syarat sampel

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 = 0,25

q = 1 - p = 0,75

d = ketepatan absolut yang dikehendaki = 0,1

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,25 \times 0,75}{(0,1)^2} = 72,03 \approx 73$$

Sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 73 pasien dengan TB positif dan dilakukan uji sensitivitas. Namun yang kami 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 10^{-5}
2. Resisten: jumlah koloni pada media berisi obat sama atau lebih dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol 10^{-5}
3. OAT: Obat Anti Tuberkulosis
4. Sputum: bahan yang dikeluarkan dari bronkus dan paru yang dalam hal ini kemungkinan mengandung BTA
5. Pus: cairan hasil proses peradangan yang terbentuk dari sel darah putih (leukosit) dan cairan encer yang sering disebut nanah
6. Kasus TB: Pasien TB yang telah dibuktikan secara mikroskopik atau didiagnosis oleh dokter
7. 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 positif

8. 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

3.8 Cara Kerja

3.8.1. Sputum:^{1,19}

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

3.8.2. Peralatan:

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

3.8.3. Prosedur Pengambilan

- diberikan pot / wadah sputum kepada pasien
- diberikan penjelasan kepada pasien cara membatukkan sputum yang baik
- wadah sputum ditaruh di dekat bibir pasien, masukan sputum 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 segera 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

3.8.5.1. Mikroskopik

3.8.5.1.1. 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

3.8.5.1.2. Cara Pewarnaan *Ziehl-Neelsen*

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 bue* 1%, biarkan selama 10-20 detik
10. dicuci dengan air mengalir dan biarkan kering di udara

3.8.5.1.3. Pembacaan hasil dan interpretasi mikroskopik

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.

3.8.5.1.4. Pencatatan dan pelaporan mikroskopik

Pencatatan hasil pembacaan mikroskopik berdasarkan skata *International Union against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*:^{1,3}

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.

3.8.5.2. Kultur

3.8.5.2.1. Homogenisasi/ konsentrasi sputum

Sebelum dilakukan pewarnaan, spesimen dihomogenisasi terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi/ infeksi terhadap petugas.^{13,19} 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 Kubica menggunakan NaOH 4%. Bahan yang tidak dapat dikerjakan segera, sebaiknya dihomogenisasi dengan TSP 10%. Bahan pus harus disentrifugasi dahulu selama 10 menit dengan kecepatan 3000rpm.

3.8.5.2.2. Isolasi

1. spesimen yang sudah diolah dipipet 0,1 mL, masukkan 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^{13,19}
5. pertumbuhan koloni diamati setiap minggu. Diamati tingkat pertumbuhan, tipe koloni, dan pigmentasi.

3.8.5.2.3. Pembacaan hasil dan interpretasi kultur

- Setiap minggu dibaca, bila ada pertumbuhan koloni dicatat tanggalnya dan hitung jumlah koloninya.
- Buat sediaan dari koloni yang tumbuh lalu lakukan 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.

3.8.5.2.4 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

3.8.5.3. Uji sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis*

3.8.5.3.1 Peralatan dan bahan

A. Persiapan larutan obat

- aquades
- neraca analitis
- obat anti tuberkulosis
- *propylene glycerol*
- penangas air
- rak tabung
- tabung reaksi

B. Persiapan media mengandung obat

- gelas ukur
- inspikator
- labu erlenmeyer
- media Lowenstein-Jensen
- tabung reaksi

C. Persiapan suspensi kuman

- aquades
- es dan wadahnya
- gelas untuk mencampur
- pipet tetes
- sengkeli
- tabung reaksi

D. Inokulasi

- Media Lowenstein-Jensen mengandung obat
- Media Lowenstein-Jensen tidak mengandung obat
- Pipet tetes
- Rak miring

3.8.5.3.2 Persiapan larutan obat

Obat yang digunakan harus berkadar murni, berbeda dengan obat yang digunakan di klinik yang berupa campuran. Obat yang digunakan harus yang disimpan dengan baik. Serbuk obat yang digunakan untuk klinik biasanya berupa campuran dan tidak dapat dipakai untuk uji sensitivitas. Jangan menggunakan tablet atau kapsul.

Tidak semua obat berkadar murni, terutama antibiotik. Misalnya, berat 1 mg

3.8.5.3.3 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.^{23,24}

3.8.5.3.4 Prosedur Perneriksaan

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 kedalam 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 diinspikasi pada suhu 90°C selama 1 jam
6. tabung-tabung yang berisi media yang sudah jadi dalam kantong plastik diimpen dan diikat rapat-rapat, lalu disimpan di lemari es jika tidak digunakan pada hari yang sama

3.8.5.3.5 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:

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	-	-	-	-	-

3.8.5.3.6 Pembacaan dan Interpretasi Hasil

- 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} dinyatakan sensitif.

3.8.2.3.7 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.

3.9 Identifikasi Variabel

Variabel yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Variabel bebas adalah Obat Anti Tuberkulosis etambutol.
- Variabel terikat adalah pola sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis*.

3.10 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

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

3.11 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.

