

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat Dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian observasional laboratorium analitik deskriptif. Pengambilan data dilakukan secara *cross sectional*.

B. Waktu Penelitian

Sampel akan diambil di RS PKU Kota Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian Pola kepekaan Antifungal dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UMY. Waktu Penelitian selama 8 bulan (Juli 2014 – Februari 2015).

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh pasien dengan gejala batuk kronis yang rawat inap maupun rawat jalan di RS PKU Kota Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah pasien gejala batuk kronis atau batuk lebih dari 8 minggu di RS PKU Kota Muhammadiyah Yogyakarta, dengan jumlah sampel berdasarkan periode waktu dan sampel minimal (jumlah kejadian batuk kronis pada periode waktu penelitian) serta memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut

a. Kriteria Inklusi

- 1) Pasien dengan gejala batuk lebih dari 8 minggu yang disebabkan oleh jamur *Candida sp.*
- 2) Pasien dengan batuk produktif (menghasilkan dahak) dan mampu mengeluarkan batuk.
- 3) Bersedia menjadi responden penelitian dan bekerja sama selama proses penelitian berlangsung

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Pasien dengan gejala batuk kurang dari 4 minggu.
- 2) Mengundurkan diri atau tidak bersedia untuk berpartisipasi.

Pada penelitian ini jumlah sampel ditentukan dari insidensi kasus batuk kronis di RS PKU Muhammadiyah Yogyakarta periode Juli 2014 – Februari 2015.

D. Tempat Dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di poliklinik atau bangsal RS PKU Muhammadiyah Yogyakarta dan Penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada Juli 2014 – Februari 2015.

E. Variabel dan Definisi Operasional**1. Variabel**

- a. Variabel Bebas : Antifungal Ketokonazole dan Flukonazole.
- b. Variabel Terikat : Kadar Hambat Minimal.

- c. Variabel Pengganggu : Inkubasi, Kontaminasi, Suhu, Jumlah Sputum, dan Sterilisasi.

2. Definisi Operasional

- a. Batuk kronis merupakan batuk lebih dari 4 minggu. Pasien batuk kronis adalah yang datang atau rawat inap di RS PKU Kota Muhammadiyah Yogyakarta yang telah diagnosis klinis oleh klinisi serta mampu mengeluarkan dahak yang dicurigai disebabkan oleh *Candida sp.*
- b. *Candida sp.* merupakan jamur penyebab infeksi saluran pernapasan dengan gejala batuk kronis yang paling umum ditemukan. *Candida Sp.* memiliki dua jenis morfologi, yaitu bentuk seperti khamir (yeast) dan bentuk hifa. Morfologi koloni *Candida sp.* pada medium padat agar Sabouraud Dekstrosa, umumnya berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin dan kadang-kadang sedikit berlipat-lipat terutama pada koloni yang telah tua.
- c. Pola Kepekaan adalah hasil pola kepekaan antifungal ketokonazole dan flukonazole terhadap jamur *Candida sp.* penyebab batuk kronis yang ditemukan pada pasien batuk kronis di RS PKU Kota Muhammadiyah Yogyakarta dengan interpretasi hasil sensitif dan resisten.
- d. Resistensi adalah ditemukan pertumbuhan jamur pada pemberian antifungal yang ditunjukkan dengan media pertumbuhan keruh.

- e. Sensitif adalah tidak ditemukan adanya pertumbuhan jamur pada pemberian antifungal ditunjukkan dengan media pertumbuhan jernih.
- f. Flukonazole adalah antifungal terbaru golongan azol yang memberikan sensitifitas pada jamur.
- g. Ketokonazol antifungal generasi pertama golongan azol yang memberikan sensitifitas pada jamur.

3. Uji Kepekaan Antifungal

Uji kepekaan antifungal adalah tes yang digunakan untuk mengetahui kepekaan jamur terhadap antifungal yang bertujuan untuk mengetahui daya kerja atau efektifitas dari suatu antifungal dalam membunuh jamur (Sulistyaningsih, 2010)

Pada penelitian ini akan menggunakan 2 antifungal, berikut :

a. Ketokonazole

Mekanisme kerja berinteraksi dengan enzim sitokrom P450 untuk menghambat metilasi lanosterol menjadi ergosterol, sehingga mengganggu fungsi membran dan meningkatkan permeabilitas membran spektrum. Bekerja secara adiktif dengan flusitosin terhadap candida. Tetapi mengantagonis aktivitas anti jamur anfoterisin B. Larut dalam asam lambung dan diabsorpsi melalui mukosa lambung (Maschmeyer, 2002).

b. Flukonazole

Berinteraksi dengan enzim sitokrom P450 untuk menghambat metilasi lanosterol menjadi ergosterol, sehingga mengganggu fungsi

membran dan meningkatkan permeabilitas membran. Obat pilihan untuk *C. neoformans*, kandidemiasis dan koksidioidomikosis, blastomikosis, kandidiasis dan histoplasmosis (Arky R, 2012)

4. *Candida* sp.

Candida Sp. merupakan salah satu mikroorganisme yang menyebabkan batuk kronis, yang memiliki ciri sebagai berikut :

- a. Makroskopis : Tampak seperti pasta, bulat, kecil dan berwarna dan berwarna putih kekuningan.
- b. Mikroskopis : Tampak berbentuk bulat, kecil berwarna biru (cat LPCB) dengan ukuran 2,0-7,0 x 3,0-8,5 μm .

F. Instrumen Penelitian

1. Alat:

- a. Ose bulat / lancip.
- b. Tabung Reaksi.
- d. Kertas Sampel.
- e. Kapas Steril.
- f. Mikropipet.
- g. Labu Takar.
- h. Inkubator.
- i. Spiritus.
- j. Mixer
- k. Sarung tangan dan Masker.

2. Bahan:

- a. Sputum dahak steril.
- b. Antifungal (Flukonazole dan Ketokonazole).
- c. Media SDA (Sabouroud Dextrose Agar).
- d. Larutan NaCl.
- e. Media CYG (Casein Yeast Glucose).

G. Cara Pengumpulan Data**1. Jalannya Penelitian****a. Tahap Persiapan**

- 1) Mengurus persuratan yang berkaitan dengan persyaratan penelitian dan perizinan kepada RS PKU Muhammadiyah Yogyakarta.
- 2) Mempersiapkan alat dan bahan untuk penelitian.
- 3) Menentukan dan menemukan subyek penelitian.

b. Tahap Pelaksanaan

- 1) Meminta persetujuan responden untuk bekerja sama dalam penelitian
- 2) Memberikan penjelasan tentang tujuan penelitian dan peran keikutsertaan dalam penelitian

c. Tahap Pengambilan Data

1) Pola Kepekaan

Pengambilan sampel dahak pada pasien dengan gejala batuk kronis di poliklinik atau bangsal RS PKU Muhammadiyah Yogyakarta yang telah teridentifikasi jamur *Candida sp.*

Melakukan uji sensitifitas untuk melihat pola kepekaan antifungal terhadap jamur *Candida sp.* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Dengan urutan pelaksanaan sebagai berikut:

a) Pembuatan larutan stok anti fungal.

Campurkan 1 tablet antifungal Ketokonazole (200 mg) dan Flukonazole (150 mg) dalam tabung reaksi berisi 10 ml NaCl. Setelah itu dilakukan perhitungan menggunakan rumus pengenceran $V_1.N_1 = V_2.N_2$ untuk mendapatkan konversi dalam 1 ml larutan antifungal = konsentrasi awal masing-masing antifungal yang diinginkan yaitu ketokonazole dengan konsentrasi awal 0.5 μg dan Flukonazole 64 μg .

b) Inkubasi suspensi Jamur.

Isi tabung reaksi dengan 8 ml CYG untuk tiap pemberian ketokonazole dan flukonazole dengan menggunakan ose steril ambil beberapa koloni jamur *Candida sp.* dari media SDA usahakan tidak mengenai

dinding tabung, lalu gojok agar tercampur sempurna.

Inkubasi selama 24 jam.

c) Pola Kepekaan (Uji Sensifitas).

(1) Tiap sampel yang telah teridentifikasi *Candida sp.* disiapkan 10 tabung, kemudian beri label pemberian antifungal "KETOKONAZOLE" dan "FLUKONAZOLE".

(2) Masukkan 1 ml NaCl dan dalam tabung ke-2 sampai tabung ke-7. lalu masukkan 1 ml larutan antifungal pada tabung ke-1 dan ke-2. Sehingga tabung ke-1 mengandung antifungal dengan konsentrasi 100% dan tabung ke-2 mengandung antifungal dengan konsentrasi 50%. Campur hingga homogen dengan menggunakan mixer.

(3) Kemudian dilakukan seri pengenceran secara seri dari tabung ke-2 sampai ke tabung ke-9 dengan cara memindahkan 1 ml larutan obat anti fungal dari tabung ke-2 ke tabung ke-3, begitu seterusnya sampai pada tabung ke-8, pastikan setiap pengambilan 1 ml dari masing-masing tabung telah dicampur sampai homogen. Sehingga pada tabung ke-8 berisi sisa pengenceran dari tabung sebelumnya.

(4) Masukkan masing-masing 1 mL suspensi jamur yang telah dibuat ke dalam tabung ke-1 hingga tabung ke-7.

Volume akhir dari tabung-1 sampai tabung ke-7 sebesar 2 ml.

(5) Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol pertumbuhan jamur (kontrol positif) adalah tabung ke-9 yang diisi 1 ml CYG dan 1 ml suspensi jamur. Kontrol sterilitas bahan (kontrol negatif) adalah tabung-10 yang hanya diisi 1 ml CYG juga ikut diinkubasikan.

(6) Diamati ada tidaknya pertumbuhan jamur dengan cara membandingkan dengan kontrol positif.

Kadar hambat minimal diperoleh dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan jamur dengan konsentrasi terendah.

d. Interpretasi

Cara menentukan *Candida* sp. sensitif atau sudah resisten terhadap antifungi keokonazole dan flukonazole menggunakan tabel CLSI.

Tabel 1. Tabel CLSI

Antifungal	Sensitif	Resisten
	KHM/MIC	KHM/MIC
Ketokonazole	$\leq 0,125\mu\text{g/ml}$	0.025-0,05 $\mu\text{g/ml}$
Flukonazole	$\leq 32\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$

e. Pembacaan hasil uji kepekaan jamur

Pembacaan hasil diukur dengan melihat ada tidaknya kekeruhan yang dibandingkan dengan kontrol positif untuk melihat kadar hambat minimal.

H. Uji Validitas dan Reliabilitas

Validitas adalah suatu ukuran yang menunjukkan tingkat kesahihan suatu alat ukur (Sukandar, 2009). Reliabilitas adalah indeks yang menunjukkan sejauh mana alat pengukur dapat dipercaya atau dapat diandalkan (Ntoadmodjo, 2002). Pada penelitian ini dikatakan sensitif apabila tidak didapatkan kekeruhan (jernih) pada tabung tersebut dibandingkan dengan tabung kontrol positif. Dikatakan resisten apabila didapatkan kekeruhan.