PENGARUH WAKTU INKUBASI TERHADAP DIAMETER ZONA HAMBAT ANTIBIOTIK PADA UJI SENSITIVITAS BAKTERI *KLEBSIELLA PNEUMONIA*

Martha Atik Martsiningsih[1]*, Suyana[1], Aisyiah Noviani[1], Ullya Rahmawati[1], Sujono[1], Fardhiasih Dwi Astuti[2]

[1]Medical Laboratory Technology Department, Health Polytechnic of Ministry of Health,Yogyakarta Ngadinegaran MJ III/62 Yogyakarta

[2]Public Health Faculty, Ahmad Dahlan University, Yogyakarta Jl.Prof Soepomo, Warungboto Umbulharjo Yogyakarta

*corresponding author, e-mail: atikmartsiningsih@gmail.com

Abstract

Background*: Several analytical factors can affect the diameter of the inhibition zone; This factor must be investigated to guarantee the validity of the sensitivity test results.*
Aims*: This study was to determine the pattern of influence of variations in incubation time on the diameter of the antibiotic inhibition zone in the sensitivity test of Klebsiella pneumoniae.*
Methode*: this research is a pre-experimental design with a Static Group Comparison design. The diameter of the antibiotic inhibition zone with variations in incubation time was measured and analyzed descriptively.*
The results*: The diameter of the inhibition zone on the variation of the incubation time showed a pattern of the influence of the incubation time on the diameter of the antibiotic inhibition zone in the bacterial sensitivity test, namely at 6-18 hours, an increase in the diameter of the inhibition zone and 18-48 hours a decrease in the diameter of the zone. Inhibit each antibiotic.* ***Conclucion****:This study concludes that there is a significant effect with the pattern of the initial incubation time (6-18 hours) affecting the broader or larger diameter of the inhibition zone and the subsequent incubation time of 18-48 hours decreasing the diameter of the inhibition.*

Keywords*: Inhibition zone diameter, incubation time, sensitivity test*

1. Pendahuluan

Infeksi bakteri banyak menjadi permasalahan di bidang kesehatan. Bakteri yang mampu menginfeksi manusia disebut bakteri patogen. Seseorang akan jatuh sakit jika reaksi sistem imun terhadap bakteri menyebabkan kerusakan. Salah satu bakteri patogen adalah *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* yang masih satu keluarga dengan Klebsiella sp. diperkirakan sekitar 5% berada di feces dan saluran nafas manusia[1].

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* banyak menjadi penyebab beberapa infeksi. Bakteri ini bisa mengakibatkan infeksi seperti infeksi pernapasan, infeksi nosokomial, infeksi saluran kemih dan kemungkinan paling buruk adalah kematian[2]. Infeksi nosokomial yang terjadi di dunia bisa dibilang tinggi yaitu 5% per tahun atau 9 juta dari total 190 juta pasien yang sedang dirawat. Tingkat kematian karena infeksi ini pun cukup tinggi yaitu 1 juta per tahunnya[3]. Data kasus pneumonia pada balita diketahui mengalami peningkatan yaitu pada tahun 2014 sebanyak 29,5%, pada tahun 2015 sebanyak 63,5%,

dan pada tahun 2016 sebanyak 65,3%. Kematian pada bayi lebih tinggi daripada anak 1-4 tahun yang diakibatkan oleh kasus pneumonia[4].

Infeksi dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat diobati menggunakan antibiotik. Antibiotik adalah senyawa alami atau sintetik yang berefek menekan atau menghentikan proses biokimia pada bakteri. Pengobatan yang direkomendasikan untuk bakteri ini tergantung dari jenis infeksi yang disebabkan. Namun dengan berjalannya waktu pemakaian antibiotik yang sembarangan atau tidak sesuai aturan dan meluas mengakibatkan sebagian resisten terhadap antibiotik[5].

Uji sensitivitas yang sering digunakan di laboratorium adalah metode disk diffusion atau difusi cakram *Kirby-Bauer*. Pada prinsipnya teknik kerja dari metode ini cukup sederhana dan lebih mudah dilakukan daripada metode sumuran, tetapi harga disk antibiotik cukup mahal. Hasil akhir dari uji sensitivitas ditentukan oleh terbentuknya diameter zona hambat, semakin lebar diameter zona hambat maka pertumbuhan bakteri semakin terhambat [6]

Uji sensitivitas ini penting sebagai dasar penentuan pengobatan antibiotik yang tepat dalam penanganan penyakit infeksi menyebabkan petugas harus mengeluarkan hasil yang valid. Pada uji ini mempunyai beberapa faktor analitik yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat. Hasil penelitian terdahulu mengenai uji teknik difusi dapat diketahui beberapa faktor analitik yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat yaitu penyerapan antibiotik kurang maksimal karena tumpukan kertas saring terlalu banyak, populasi bakteri, konsentrasi antimikroba, komposisi media kultur, waktu inkubasi dan temperatur [6]. Sedangkan pada penelitian lain disebutkan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat yaitu kecepatan antimikroba dalam berdifusi, derajat sensitivitas bakteri, dan kecepatan pertumbuhan bakteri [7]. Hasil penelitinan lain menunjukkan stabilitas kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, sefalotin, siprofloksasin, dan tobramisin dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Stabilitas antibiorik menjadi factor penting dalam pengobatan. Evaluasi uji susceptibility tes antibiotic perlu dilakukan dengan mempertimbangkan waktu inkubasi dan tingkat inokulasi untuk memberikan rekomendasi yang tepat untuk pengobatan[8] Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap diameter zona hambat antibiotik pada uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae.*

2. Metode Penelitian

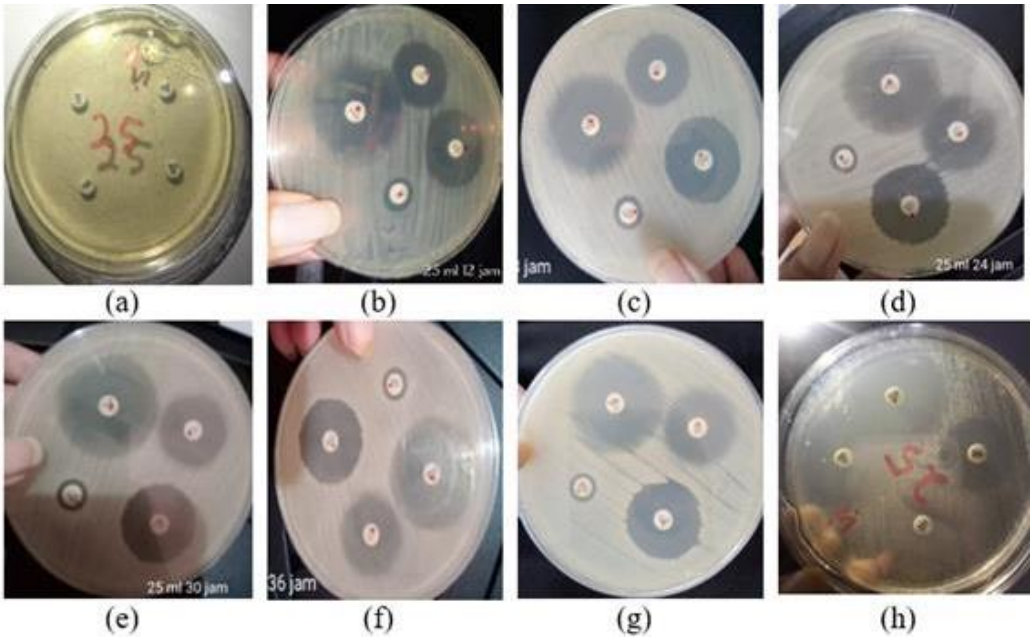
Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian pra-eksperimen dengan desain *Static Group Comparison.* Pengulangan yang dilakukan yaitu 4 kali berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer pada masing- masing kelompok penelitian yaitu pada variabel

waktu inkubasi, sehingga jumlah data 8 x 4 = 32 data pengujian. Subjek penelitian yang digunakan adalah *Klebsiella pneumoniae* dengan objek penelitian observasi makroskopis diameter zona hambat obat antibiotik dari uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan media Mueller Hinton Agar dengan variasi lama waktu inkubasi 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi waktu inkubasi, sedangkan variabel terikat yaitu hasil pengukuran diameter zona hambat. Variasi waktu inkubasi adalah berbagai waktu inkubasi yang digunakan pada proses perlakuan inkubasi media *Mueller Hinton* Agar pada pemeriksaan sensitivitas bakteri Klebsiella pneumoniae, yaitu 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam dengan skala variabel rasio. Diameter zona hambat jernih (radikal) yang terbentuk di seputaran disk obat antibiotik diukur menggunakan alat jangka sorong digital dan ditetapkan dalam angka desimal dua angka dibelakang koma dengan satuan millimetre (mm), skala variabel rasio. Data yang diperoleh dilakukan analisis deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3. Hasil dan Pembahasan

Penelitian dengan judul "Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Diameter Zona Hambat Antibiotik Pada Uji Sensitivitas Bakteri *Klebsiella pneumoniae*" telah dilaksanakan pada bulan januari 2022 di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Hasil pengambilan data dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan. Data pada penelitian ini berupa data primer yang didapatkan secara langsung dengan cara mengukur diameter zona hambat dari uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada media Mueller Hinton Agar menggunakan variasi lama waktu inkubasi. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan cara mengukur diameter hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong digital. Hasil pengamatan yang dilakukan secara makroskopis uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang ditanam pada media Mueller Hinton Agar dengan variasi lama waktu inkubasi 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. hasil pengamatan makroskopis dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada media Mueller Hinton Agar dengan waktu inkubasi yang bervariasi dengan pertumbuhan koloni tebal, keruh, merata, warna putih susu dan permukaannya licin. Sedangkan uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* terhadap beberapa antibiotik yaitu gentamicin, amikacin, cefepim dan meropenem membentuk zona hambat berupa daerah bening transparan di sekitar disk obat.



Gambar1: Pengamatan makroskopis uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada media Mueller Hinton Agar dengan variasi lama waktu inkubasi 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam (a-h)

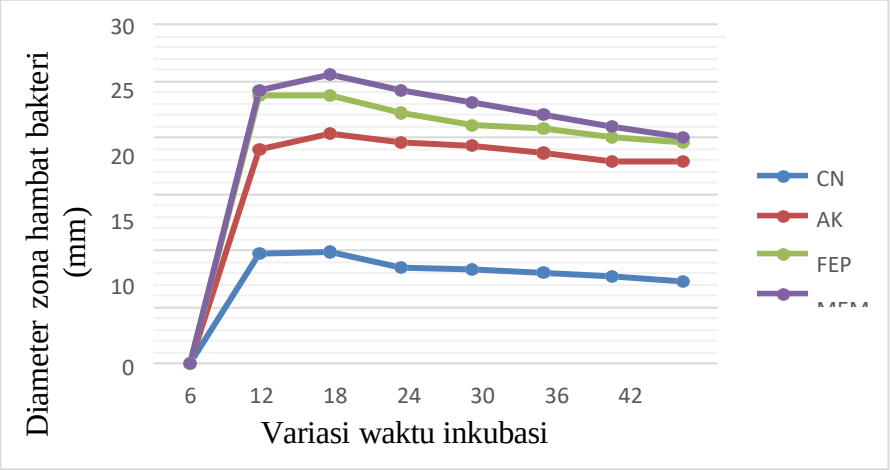
Zona yang terbentuk pada penelitian ini adalah radikal dan iradikal. Zona radikal merupakan zona yang jernih tanpa ada pertumbuhan bakteri sedangkan zona iradikal merupakan zona keruh tetapi lebih jernih jika dibandingkan dengan zona sekitarnya. Dari masing-masing zona yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong digital berdasarkan variasi waktu yang telah ditentukan kemudian data pengulangan di rata- rata untuk mengetahui rerata diameter zona hambat yang terbentuk pada semua pengulangan dengan variasi waktu tertentu. Hasil pengukuran penelitian ini dapat ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1: Rata rata Zona Hambat berdasarkan waktu inkubasi dari Obat Uji.

Jenis Antibiotik	Rerata Zona hambat (millimeter) pada masing masing waktu inkubasi (Jam)							
	6	12	18	24	30	36	42	48
Gentamicin (CN)	0,00	9,67	9,91	8,48	8,38	7,96	7,71	7,24
Amikacin (AK)	0,00	18,99	20,36	19,51	19,33	18,62	17,89	17,81
Cefepim (FEP)	0,00	23,74	23,78	22,2	21,04	20,82	20,02	19,56
Meropenem (MEM)	0,00	24,15	25,61	24,25	23,07	22,03	21,02	20,06

Sumber : Data penelitian

Tabel 1 menunjukkan bahwa variasi waktu inkubasi selama 6-48 jam mempengaruhi hasil dari pembentukan rerata diameter zona hambat pada masing-masing jenis antibiotik yaitu gentamicin (CN), amikacin (AK), cefepim (FEP), dan meropenem (MEM). Pada waktu inkubasi awal yaitu 6-18 jam berpengaruh semakin lebar atau besar pembentukan diameterzona hambat dan pada waktu inkubasi selanjutnya yaitu 18-48 jam berpengaruh semakin menyempit atau mengecilnya pembentukan diameter zona hambat. Perbandingan rerata pengaruh waktu inkubasi terhadap diameter zona hambat antibiotik pada uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae*, data dapat dilihat dalam bentuk grafik yang disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2: Grafik Zona hambat dari tiap Obat

Gambar 2 menunjukkan bahwa adanya variasi waktu inkubasi memiliki pengaruh pada pembentukan zona hambat antibiotik yaitu rerata zona hambat antibiotik sebelum 18 jam akan terus mengalami peningkatan tetapi setelah lebih dari 18 jam zona hambat antibiotik akan terus berkurang atau mengecil pada berbagai jenis antibiotic yaitu CN, AK, FEP, dan MEM yang ditunjukkan oleh arah garis grafiknya naik pada waktu inkubasi 6-18 jam dan menurun pada waktu inkubasi 18-48 jam. Dari data hasil rerata diameter zona hambat antibiotik yang didapat kemudian diinterpretasikan ke dalam tingkat kekuatan daya hambat dari masing-masing antibiotik pada variasi waktu inkubasi yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Interpretasi Kriteria Tingkat Kekuatan Daya Hambat Bakteri *Klebisella pneumoniae*

Jenis antibiotik	Diameter zona hambat, kekuatan daya hambat							
	6 jam	12 jam	18 jam	24 jam	30 jam	36 jam	42 jam	48 jam
Gentamicin (CN)	0 Lemah	9,67 Sedang	9,91 Sedang	8,48 Sedang	8,38 Sedang	7,96 Sedang	7,71 Sedang	7,24 Sedang
Amikacin (AK)	0 Lemah	18,99 Kuat	20,36 Kuat	19,51 Kuat	19,33 Kuat	18,62 Kuat	17,89 Kuat	17,81 Kuat
Cefepim (FEP)	0 Lemah	23,74 Sangat kuat	23,78 Sangat kuat	22,2 Sangat kuat	21,04 Sangat kuat	20,82 Kuat	20,02 Kuat	19,56 Kuat
Meropenem (MEM)	0 Lemah	24,15 Sangat kuat	25,61 Sangat kuat	24,25 Sangat kuat	23,07 Sangat kuat	22,03 Sangat kuat	21,02 Sangat kuat	20,06 Kuat

Sumber: Data penelitian

Tabel 2. Menunjukkan bahwa setiap antibiotik memiliki pola pengaruh waktu inkubasi terhadap diameter dan kekuatan daya hambat yang berbeda-beda. Antibiotik CN memiliki pola pengaruh dari lemah – sedang – sedang – sedang – sedang – sedang – sedang – sedang. Antibiotik AK memiliki pola pengaruh dari lemah – kuat – kuat – kuat – kuat – kuat – kuat – kuat. Antibiotik FEP memiliki pola pengaruh dari lemah – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – kuat – kuat – kuat. Antibiotik MEM memiliki pola pengaruh dari lemah – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – sangat kuat – kuat. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan yang signifikan diameter zona hambat antibiotik pada uji sensitivitas bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan variasi waktu inkubasi menggunakan Mueller Hinton Agar (MHA) dengan hasil yang dapat diliiat pada tabel 2. Ketika waktu inkubasi 6 jam masing-masing disekitar disk obat belum terbentuk zona hambat antibiotik kemudian pada 12 jam mulai terbentuk zona hambat antibiotik di sekitar disk obat. Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing disk obat berbeda-beda karena kemampuan daya hambat yang tidak sama terhadap bakteri penguji. Dari waktu inkubasi 12 jam ke 18 jam, zona hambat masing-masing disk mengalami peningkatan yang bervariasi. Kemudian pada waktu inkubasi 18 jam ke 24 jam, 30 jam, 36 jam, 42 jam, dan 48 jam, zona hambat masing-masing disk mengalami penurunan yang bervariasi. Hal inisebanding dengan pernyataan Karen C. Carol, MD dkk bahwa pada beberapa kondisi, mikroorganisme tidak dimatikan namun hanya dihambat melalui pajanan singkat oleh obat antimikroba. Semakin lama masa inkubasi maka semakin besar pula kesempatan mutan yang resisten untuk muncul atau anggota yang paling tidak

sensitif terhadap obat antimikroba untuk memperbanyak diri seiring berkurangnya kemampuan daya hambat obat antimikroba [9].

Berdasarkan uji sensitivitas pada penelitian ini menunjukkan bahwa variabel terikat berupa pengukuran diameter zona hambat antibiotik yang memiliki lebar diameter paling besar yaitu pada variasi waktu inkubasi selama 18 jam. Pada jenis antibiotik gentamicin memiliki lebar diameter zona hambat 9,91 mm, jenis antibiotik amikacin memiliki lebar diameter zona hambat 20,36 mm, jenis antibiotik cefepim memiliki lebar diameter zona hambat 23,78 mm dan jenis antibiotik meropenem memeliki lebar diameter zona hambat 25,61 mm. Terkadang masa inkubasi ini tidak didasarkan dari karakter pertumbuhan dan pembunuhan bakteri tetapi lebih pada hari kerja teknisi laboratorium.

Waktu inkubasi yang biasa digunakan pada laboratorium adalah 24 jam yang dimana teknisi laboratorium pulang pada malam hari dan kembali keesokan paginya. Sangat jelas bahwa hasil uji sensitivitas yang lebih baik dan cepat sangat diinginkan untuk tujuan pengendalian penyakit infeksi. Penyakit infeksi terjadi jika bakteri atau reaksi imunitas tubuh terhadap mereka menyebabkan kerusakan yang cukup tinggi [10]. Penyakit infeksi biasanya diobati dengan antibiotik. Antibiotik akan menghambat pertumbuhan atau menghancurkan bakteri. Penggunaan antibiotik harus disesuaikan dengan kebutuhan. Antibiotik terapi dibagi menjadi antibiotik terapi empiris dan antibiotik terapi definitif. Antibiotik terapi empiris merupakan penggunaan obat antibiotik dalam kasus infeksi yang belum diketahui bakteri penyebab infeksi sedangkan antibiotik terapi definitif merupakan penggunaan obat antibiotik yang sudah diketahui jenis bakteri serta pola resistensinya. Jika terdapat waktu inkubasi yang lebih cepat dan baik ini sangat akan membantu dalam pengobatan yang jauh lebih cepat dengan terapi spektrum yang tepat atau dikurangi sebelumnya sehingga dapat menyebabkan penurunan mortalitas bakteri. Akan tetapi dalam konsep yang menarik ini belum bisa diterima secara umum dan belum didukung baik oleh *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) atau *Clinical and laboratory Standards Institute* (CLSI) [11]. Hal ini bisa disebabkan karena alur kerja di laboratorium mikrobiologi medis yaitu hasil yang tidak tersedia selama jam kerja tidak mungkin digunakan pada hari itu juga.

4. Kesimpulan

Variasi waktu inkubasi mempengaruhi zona hambat tiap obat antibiotik. Waktu inkubasi awal yaitu 6-18 jam berpengaruh semakin lebar atau besar terbentuknya zona hambat dan pada waktu inkubasi selanjutnya yaitu 18-48 jam mengalami penurunan zona hambat antibiotik.

Daftar Pustaka

1. Warganegara, E., Apriliana, E. & Ardiansyah, R. Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Luka Operasi (ILO) Nosokomial Pada Ruang Rawat Inap Bedah dan Kebidanan RSAM di Bandar Lampung. *Pros. SNSMAIP III* 344–348 (2012).
2. Tarina, N. T. I. & Kusuma, S. A. F. Deteksi Bakteri Klebsiella pneumonia.*J. Farmaka* **15**, 119–126 (2017).
3. Konoralma, K. Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial Di Rumah Sakit Umum GMIM Pancaran Kasih Manado. **8**, 23–35 (2019).
4. Kemenkes. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2019*. *Short Textbook of Preventive and Social Medicine* (Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2020). doi:10.5005/jp/books/11257_5.
5. Mazzariol, A., Bazaj, A. & Cornaglia, G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J. Chemother.* **29**, 2–9 (2017).
6. Khusuma, A., Safitri, Y., Yuniarni, A. & Rizki, K. Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan Escherichia Coli Sebagai Bakteri Uji. *J. Kesehat. Prima* **13**, 151 (2019).
7. Soleha, T. U. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *Juke Unila* vol. 5 121(2015).
8. Laure, N. N., Dawan, J. & Ahn, J. Effects of Incubation Time and Inoculation Level on the Stabilities of Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics against Salmonella Typhimurium. *Antibiotics* **10**, (2021).
9. Carrol, K. C. *et al. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg Ed 27*. (penerbit buku kedokteran EGC, 2017).
10. Brooks, G. F., Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. & Mietzner, T. A. *Medical Microbiology*. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0- 323-40181-4.00114-6.
11. van den Bijllaardt, W., Buiting, A. G., Mouton, J. W. & Muller, A. E. Shortening the incubation time for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion for Enterobacteriaceae: How short can it be and are the results accurate? *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 631–637 (2017).