

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Disiplin ilmu yang terkait dalam penelitian ini adalah Ilmu Mikrobiologi, Ilmu Kesehatan Anak, dan Ilmu Kesehatan Masyarakat.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

4.2.1 Tempat penelitian

1. Pengambilan data berupa sampel swab nasofaring dan kuesioner di posyandu dan PAUD di kecamatan Gayamsari dan Gunungpati kota Semarang.
2. Identifikasi mikrobiologi di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Juli 2013.

4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian observasional analitik dengan pengambilan data secara *cross sectional*.

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi target

Seluruh balita di wilayah Kotamadya Semarang.

4.4.2 Populasi terjangkau

Balita di kecamatan Gayamsari dan kecamatan Gunungpati kota Semarang.

4.4.3 Sampel

Balita yang tinggal di kecamatan Gayamsari dan kecamatan Gunungpati kota Semarang yang telah dipilih memenuhi kriteria sebagai berikut:

4.4.3.1 Kriteria inklusi

1. Balita usia 6 bulan – 5 tahun yang sedang berada di posyandu dan playgroup pada saat penelitian dilakukan.
2. Balita (orang tua balita) yang bersedia atau tidak menolak saat dilakukan prosedur penelitian, yang meliputi swab nasofaring setelah diberi *informed consent*.
3. Subyek bebas dari gejala dan tanda infeksi saluran napas saat pengambilan sampel dan tidak sedang mendapat antibiotik.

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

1. Terdapat lesi pada mukosa saluran napas.
2. Subyek tidak kooperatif saat prosedur penelitian, yang meliputi swab nasofaring.

4.4.4 Cara sampling

Sampel diambil dari swab nasofaring, pemilihan subyek dengan sistem *consecutive sampling*.

4.4.5 Besar sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus berikut

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P_1 Q_1 + P_2 Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$
$$n = \frac{(1,645 \sqrt{2(0,195 \times 0,805 + 0,842 \sqrt{0,12 \times 0,88 + 0,27 \times 0,73})})^2}{(0,12 - 0,27)^2}$$

$$n = 86$$

Keterangan :

n = besar sampel yang diperlukan

α = 0,05

β = 0,8

Z_{α} = deviat baku normal $\alpha = 1,645$

Z_{β} = deviat baku normal $\beta = 0,842$

P_1 = 0,12 (proporsi *S. pneumonia* yang resisten terhadap berbagai macam antibiotik, berdasarkan penelitian Al-Tawfiq tahun 2004)

P_2 = 0,27 (berdasarkan estimasi peneliti sebesar 0,15% lebih tinggi dari P_1)

P = $1/2 (P_1 + P_2) = 0,24$

Q = $1 - P$

Jadi sampel untuk setiap kecamatan minimal 86 balita.

Sampel keseluruhan adalah $2 \times 86 = 172$ balita.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Lokasi tempat tinggal balita.

4.5.2 Variabel terikat

Pola kepekaan *S. pneumoniae* terhadap antibiotik.

4.6 Definisi operasional

Kategori variabel	Nama variabel	Definisi operasional	Skala	Nilai data
Bebas	Lokasi tempat tinggal balita	Tempat tinggal balita sehari-hari. Balita yang berada ditengah kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu atau PAUD di Kecamatan Gayamsari. Balita yang berada dipinggir kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu atau PAUD di Kecamatan Gunungpati.	Nominal	0 = Tempat tinggal balita berada di wilayah Kecamatan Gayamsari 1 = Tempat tinggal balita berada di wilayah Kecamatan Gunungpati
Terikat	Resistensi terhadap penisilin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk oxacillin 1 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 20 mm (sensitif) 1 = ≤ 19 mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap vankomisin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk vankomisin 30 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 17 mm (sensitif) 1 = ≤ 16 mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap erythromycin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk erythromycin 15 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 21 mm (sensitif) 1 = ≤ 20 mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap tetrasiklin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk tetrasiklin 30 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 23 mm (sensitif) 1 = ≤ 22 mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap lefloxacin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk levofloxacin 5 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 17 mm (sensitif) 1 = ≤ 16 mm (tidak sensitif)

Terikat	Resistensi terhadap trimethropim-sulfamethoxazole	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk trimethropim-sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = ≥ 19 mm (sensitif) 1 = ≤ 18 mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap penisilin dan ≥ 2 antibiotik lain	Diameter zona inhibisi resisten terhadap disk oxacillin dan ≥ 2 antibiotik lain (vankomisin, levofloxacin, tetrasiklin, trimethropim-sulfamethoxazole, dan erythromycin) sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = Bukan MDR 1 = MDR

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

- Media Agar Darah + gentamisin 5%
- Media Agar Darah
- Media Transport STGG
- Disk Optochin
- Reagen untuk pengecatan gram: Crystal violet, Larutan lugol, Alkohol absolut, Larutan safranin
- Disk Antibiotik:
 - Oxacillin 1 µg
 - Erythromycin 15 µg
 - Tetrasiklin 30 µg
 - Vankomisin 30 µg
 - Levofloxacin 5 µg
 - Trimethroprim-sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg

4.7.2 Alat

- Kuesioner
- Alat swab khusus nasofaring
- Inkubator
- Osse
- Deck glass
- Kaca objek
- Bunsen
- Mikroskop
- Lidi kapas steril
- Plate
- Standar McFarland 0,5

4.7.3 Jenis data

Data yang digunakan adalah data primer dari penelitian pada bayi dan anak balita.

4.7.4 Cara kerja

4.7.4.1 Cara pengambilan sampel

Apusan nasofaring diambil menggunakan alat swab khusus nasofaring. Subyek dalam posisi menghadah, fiksasi kepala dengan satu tangan memegang dahi atau dagu subyek. Apusan nasofaring diambil dengan standar metode klinis, dengan cara memasukkan swab kedalam hidung dengan arah mendatar cenderung naik sampai nasofaring, kemudian putar tiga kali atau selama 5 detik. Spesimen

swab dimasukkan kedalam media transport STGG. Tiap media STGG diberi kode dengan nama subyek dan tanggal pengambilan.^{56,57}

4.7.4.2 Isolasi primer

Isolasi primer dikerjakan dengan cara Streak-Plate technique. Pada dasar piring petri dibuat 2 daerah dengan spidol. Swab digoreskan pada permukaan media Agar darah + gentamisin 5% pada daerah 1 seluas 2 cm². Menyeterilkan osse, kemudian bekas goresan alat swab tadi dilakukan goresan berulang dan rapat pada daerah 1. Osse disterilkan, goresan dilanjutkan ke daerah 2 dan seterusnya hingga daerah 3. Osse kembali disterilkan, piring petri ditutup kemudian diberi label nama subyek dan tanggal inkubasi. Media dieramkan pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni dilihat setelah 24 jam.^{12, 58}

4.7.4.3 Identifikasi *S. pneumoniae*

1) Tes optochin

Identifikasi bakteri menggunakan uji optochin. Koloni murni pada media agar darah diambil, kemudian digoreskan diatas media agar darah yang baru. Optochin disk diletakkan ditengah-tengah inokulasi. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam 5% CO₂. Mengamati zona inhibisi yang terbentuk, bila zona inhibisi memiliki diameter >14 mm menunjukkan positif *S. pneumoniae*.^{9, 33}

2) Pengecatan Gram

Untuk identifikasi bakteri dengan pengecatan gram, yang pertama harus dilakukan adalah meneteskan larutan garam fisiologis pada obyek gelas. Suspensi bakteri diambil menggunakan osse steril, dicampurkan dengan garam fisiologis

hingga merata. Setelah rata preparat digenangi dengan crystal violet selama 1 menit, kemudian sisa cat dibuang. Langkah selanjutnya preparat digenangi dengan lugol selama 1 menit, buang sisa cat kemudian gunakan air mengalir untuk mencuci. Selanjutnya mencuci preparat menggunakan alkohol absolut sampai semua cat tampak larut. Setelah larut, preparat dicuci lagi menggunakan air mengalir, kemudian genangi dengan larutan safranin selama 45 detik. Preparat dibilas menggunakan air mengalir dan keringkan. Selanjutnya preparat bisa diperiksa dibawah mikroskop.⁵⁸

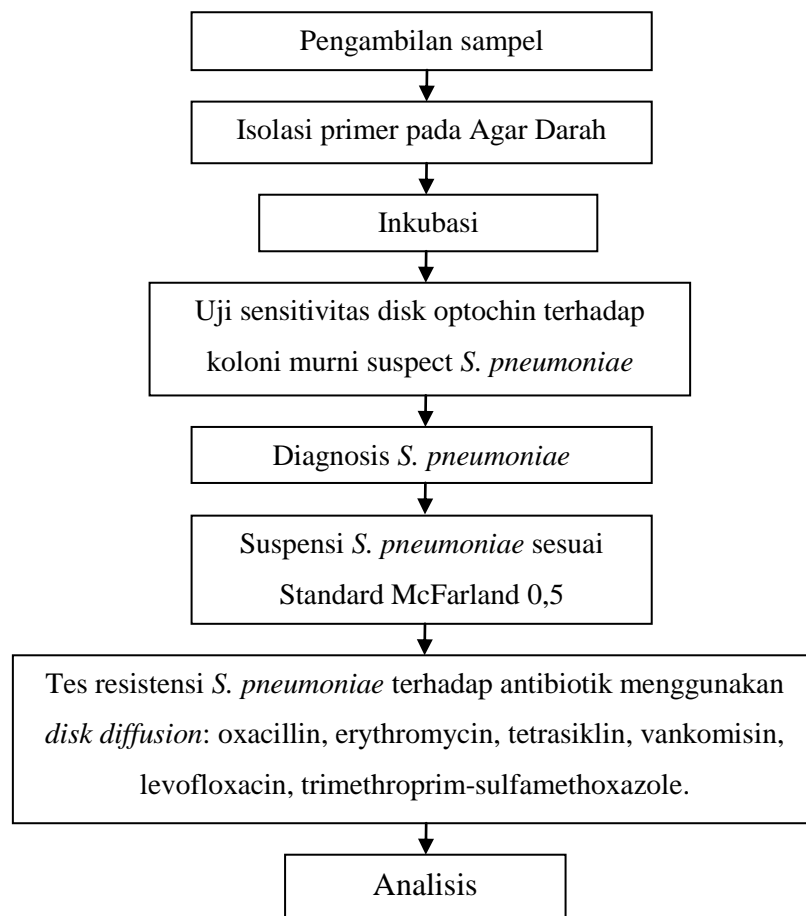
4.7.4.4 Tes resistensi terhadap antibiotik (Metode *Disc Diffusion*)

Membuat suspensi bakteri *S. pneumoniae* sesuai Standar McFarland 0,5. Langkah berikutnya mengoleskan suspensi *S. pneumoniae* pada permukaan media agar darah sebanyak tiga kali sambil diputar 60° setiap melakukan goresan. Tutup piring agar, biarkan inokulasi pada suhu ruang selama beberapa menit supaya mengering. Meletakkan disk antibiotik pada permukaan agar dengan menggunakan pinset. Menginkubasi pada suhu 35⁰C selama 24 jam. Mengukur zona inhibisi dengan satuan milimeter. Kemudian mengkategorikan kepekaan terhadap antibiotik sesuai rekomendasi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). *S. pneumoniae* dikatakan sensitif terhadap antibiotik apabila termasuk dalam kriteria *susceptible*, dan dikatakan resisten apabila termasuk dalam kriteria *intermediate* dan *resistant*.^{51, 58} Kriteria tersebut sesuai disebutkan tabel 2.

Tabel 2. Kriteria pola kepekaan antibiotik menurut CLSI 2012.⁵¹

No	Jenis antibiotik	Disk antibiotik	Kriteria diameter zona inhibisi (mm)		
			S	I	R
1	Penisilin	1 µg oxacillin	≥20	–	–
2	Vankomisin	30 µg vankomisin	≥17	–	–
3	Erythromycin	15 µg erythromycin	≥21	16-20	≤15
4	Tetrasiklin	30 µg tetrasiklin	≥23	19-22	≤18
5	Levofloxacin	5 µg levofloxacin	≥17	14-16	≤13
6	Trimethropim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg trimethropim-sulfamethoxazole	≥19	16-18	≤15

4.8 Alur penelitian



4.9 Analisis data

Pengolahan data dilakukan dengan tahapan cleaning, coding, tabulasi dan analisis data. Data dianalisis dengan analisis deskriptif, bivariat. Analisis bivariat dilakukan dengan menggunakan *Chi square*. Apabila syarat-syarat *Chi square* tidak dipenuhi maka dilakukan uji alternatif yaitu *Fischer exact test*. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.⁵⁹

4.10 Etika penelitian

Ethical clearance diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran UNDIP.

4.11 Jadwal penelitian

Jadwal penelitian adalah sebagai berikut :

Kegiatan	Bulan						
	1	2	3	4	5	6	7
Penyusunan proposal	■	■					
Ujian Proposal		■					
Ethical clearance			■	■			
Penyediaan alat dan bahan			■	■			
Pengambilan sampel					■	■	
Wawancara dan kuesioner					■	■	
Penelitian di Laboratorium					■	■	■
Analisa Hasil						■	■
Pembuatan laporan akhir							■