

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup Penelitian**

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

#### **4.2 Tempat dan waktu penelitian**

##### **4.2.1 Tempat penelitian**

1. Pengambilan data berupa sampel swab nasofaring dan kuesioner diadakan di posyandu dan PAUD di kecamatan Gayamsari dan Gunungpati Semarang.
2. Identifikasi mikrobiologi diadakan 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**

Populasi target penelitian ini adalah seluruh balita di wilayah Kotamadya Semarang.

##### **4.4.2 Populasi terjangkau**

Populasi terjangkau adalah balita di kecamatan Gayamsari dan kecamatan Gunungpati kota Semarang.

### 4.4.3 Sampel

Sampel adalah apusan nasofaring pada balita yang tinggal di kecamatan Gayamsari dan kecamatan Gunungpati Semarang:

#### 4.4.3.1. Kriteria inklusi

- a. Balita usia 6 bulan – 5 tahun yang berada di posyandu dan playgroup pada saat penelitian dilakukan.
- b. Balita dengan orang tua yang bersedia atau tidak menolak saat dilakukan prosedur penelitian yang meliputi swab nasofaring setelah diberi informed consent.
- c. Subyek bebas dari gejala dan tanda infeksi saluran napas saat pengambilan sampel

#### 4.4.3.2. Kriteria eksklusi

- a. Terdapat lesi pada mukosa saluran napas.
- b. Subyek tidak kooperatif sehingga tidak dapat dilakukan pengambilan sampel

### 4.4.4 Cara sampling

Pemilihan subyek dengan menggunakan sistem *consecutive sampling*.

### 4.4.5 Besar sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus berikut

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$
$$n = \frac{(1,645 \sqrt{2 \times 0,1175 \times 0,8825} + 0,842 \sqrt{0,085 \times 0,915 + 0,235 \times 0,765})^2}{(0,085 - 0,235)^2}$$

$$n = 64$$

Keterangan :

n = besar sampel yang diperlukan

$\alpha$  = 0,05

$\beta$  = 0,8

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

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

$P1 = 0,085$  (proporsi *Klebsiella sp.* penghasil ESBL, berdasarkan penelitian Tsang *et al* pada tahun 2000)

$P2 = 0,235$ (berdasarkan estimasi peneliti sebesar 0,15% lebih tinggi dari P1)

$P = \frac{1}{2} (P1+P2)$

$Q = 1-P$

$d =$  tingkat ketepatan absolut yang dikehendaki

Jadi sampel minimal tiap kecamatan adalah 64

Total sampel seluruhnya adalah 128

## 4.5 Variabel penelitian

### 4.5.1 Variabel bebas

Lokasi tempat tinggal balita dan riwayat pemakaian antibiotik 3 bulan terakhir.

### 4.5.2 Variable tergantung

Pola kepekaan *Klebsiella sp.* terhadap antibiotik

## 4.6 Definisi operasional variabel

**Tabel 4.** Definisi operasional

Kategori variabel	Nama variable	Definisi operasional	Skala	Nilai data
Bebas	Lokasi tempat tinggal	Tempat tinggal balita sehari – hari . Balita yang berada di tengah kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu Kecamatan Gayamsari.	Nominal	0 = Tempat tinggal balita berada dalam wilayah Kecamatan Gayamsari
		Balita yang berada di pinggir kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu Kecamatan Gunungpati.		1 = Tempat tinggal balita berada dalam wilayah Kecamatan Gunungpati
	Riwayat antibiotik 3 bulan terakhir	Riwayat konsumsi/minum antibiotik selama 3 bulan terakhir. Data diukur menggunakan kuesioner pada orangtua	Nominal	0 = Tidak mengkonsumsi antibiotik selama 3 bulan terakhir 1 = Pernah mengkonsumsi antibiotik

selama 3 bulan terakhir.

Terikat	Resistensi terhadap Amoxicillin-clavulanic acid	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk amoxicillin-clavulanic acid 20/10 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 20$ mm (sensitif) 1 = $\leq 19$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap cefotaxime	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk cefotaxime 30 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 26$ mm (sensitif) 1 = $\leq 25$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap ciprofloxacin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk ciprofloxacin 5 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 21$ mm (sensitif) 1 = $\leq 20$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap chloramphenicol	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk chloramphenicol 30 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 18$ mm (sensitif) 1 = $\leq 17$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap cotrimoxazol	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk trimethoprim-sulfamethoxazole 1,25/23,75 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 16$ mm (sensitif) 1 = $\leq 15$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap gentamicin	Diameter zona inhibisi pada uji kepekaan menggunakan disk gentamicin 10 µg sesuai standar CLSI	Nominal	0 = $\geq 15$ mm (sensitif) 1 = $\leq 14$ mm (tidak sensitif)
Terikat	Resistensi terhadap antibiotik golongan $\beta$ lactam dan >2 golongan antibiotik	Diameter zona inhibisi resisten terhadap disk cefotaxime, amoxicillin-clavulanic acid dan $\geq 2$ antibiotik lain (trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, gentamicin, ciprofloxacin) sesuai standar CLSI.	Nominal	0 = Bukan MDR 1 = MDR

## 4.7 Cara pengumpulan data

### 4.7.1 Bahan habis pakai

- Media Agar Darah
- Media Mac Conkey
- Media TSI Agar
- Media Semisolid
- Reagen untuk pengecatan Gins-Burri
- Disk antibiotik:
  - Amoxicillin-clavulanic acid    20/10µg
  - Cefotaxime                            30µg
  - Ciprofloxacin                        5µg
  - Chloramphenicol                    30µg
  - Cotrimoxazol                        1,25/23,75µg
  - Gentamicin                            10µg

### 4.7.2 Alat

- Kuesioner
- Swab nasofaring
- Inkubator
- Oase
- Deck glass dan kaca objek
- Tabung reaksi
- Cawan petri
- Mikroskop

### **4.7.3 Jenis data**

Data yang digunakan adalah data primer berupa kuesioner dan hasil pemeriksaan laboratorium dari balita.

### **4.7.4 Cara kerja**

#### **A. Swab nasofaring**

Apusan nasofaring diambil menggunakan alat swab khusus nasofaring. Subyek dalam posisi menengadah, fiksasi kepala dengan satu tangan memegang dahi atau dagu subyek. Apusan nasofaring diambil dengan standar metode klinis, dengan cara memasukan 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.<sup>36</sup>

#### **B. Isolasi primer**

Isolasi primer dilakukan pada media Agar Darah dan Mac Conkey. Alat swab digoreskan pada Agar Darah dan Mac Conkey. Alat swab digoreskan pada media Mac Conkey dan Blood Agar kurang lebih seluas 2 cm<sup>2</sup>. Oase dipanaskan, lalu bekas goresan alat swab tadi digoreskan pada zona I media Mac Conkey dan Blood Agar dengan goresan yang rapat, lalu zona II dan zona III. Setiap melakukan goresan pada tiap zona, terlebih dahulu oase disterilkan. Media diberi kode, yaitu nama subyek dan tanggal. Inkubasi dilakukan pada inkubator dengan CO<sub>2</sub> 5%, suhu 35° C, selama 48 jam, pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap 24 jam.<sup>21, 37</sup>

### C. Identifikasi bakteri

#### 1. Uji biokimiawi pada media TSIA

Koloni murni pada media Agar Darah atau Mac Conkey diambil menggunakan jarum lurus kemudian ditusuk dan digores pada media TSIA. Hasil diamati setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Data yang didapat dari percobaan ini yaitu fermentasi glukosa, produksi gas, dan hidrogen sulfida.<sup>21</sup>

#### 2. Uji motilitas

Koloni pada media pembiakan diambil dengan menggunakan jarum ose. Jarum ose kemudian ditusukkan secara tegak lurus ke dalam tabung yang mengandung media semisolid. Kemudian diamati perubahan yang terjadi disekitar tusukan jarum tersebut.<sup>21</sup>

#### 3. Pengecatan kapsul (Metode Burry Gins)

Dua kaca objek yang bersih dan bebas lemak disiapkan. Pertama diambil 1 ose tinta cina, dan diletakkan pada bagian pinggir kaca objek. Langkah berikutnya diambil 1 ose suspensi bakteri, dan dicampurkan dengan tinta cina sampai homogen. Dengan ujung kaca objek yang lain dibuat apusan, dibiarkan kering dan fiksasi. Setelah kering, ditambahkan carbol fuschin 1/10 selama 1 menit. Sisa cat dibuang dan dikeringkan, setelah itu diperiksa dibawah mikroskop.<sup>25</sup>

### D. Tes Kepekaan terhadap antibiotik dengan *disc diffusion method*:

Suspensi bakteri *Klebsiella sp.* dibuat sesuai Standar McFarland 0,5. Setelah suspensi dibuat, suspensi *Klebsiella sp.* dioleskan pada permukaan *Mueller-Hinton agar* 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 amoxicillin – clavulanic acid,

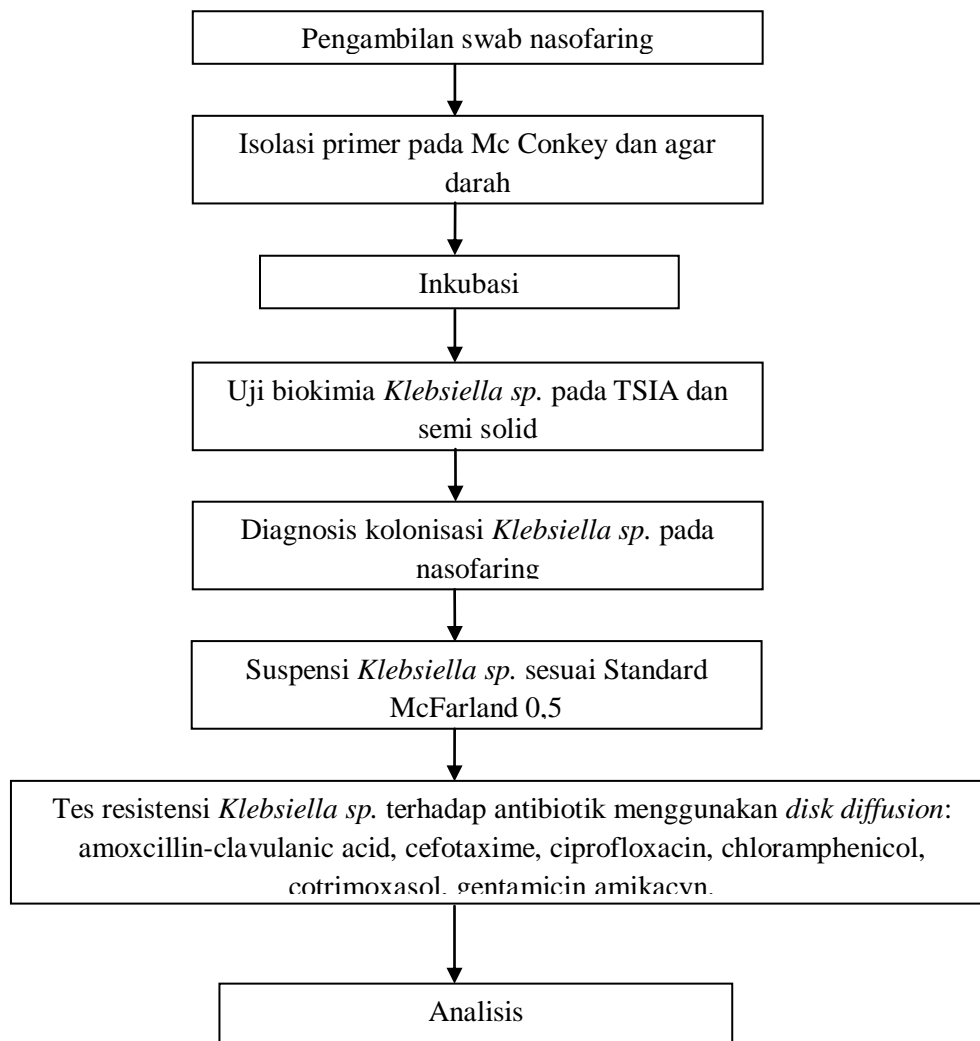
cefotaxime, ciprofloxacin, chloramphenicol, cotrimoxazol, gentamicin pada permukaan agar dengan menggunakan pinset. *Mueller-Hinton agar* yang sudah dioleskan suspensi dan ditanam disk antibiotik, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> selama 18-24 jam. Zona inhibisi diukur dengan satuan milimeter. Kepekaan antibiotik dikategorikan sesuai rekomendasi (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). *Klebsiella sp.* dikatakan sensitif terhadap antibiotik apabila termasuk dalam kriteria *susceptible*, dan dikatakan resisten apabila termasuk dalam kriteria *intermediate* dan *resistant*.<sup>38</sup> Kriteria pola kepekaan antibiotik menurut CLSI 2012 ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Kriteria pola kepekaan antibiotik menurut CLSI 2012

No	Jenis antibiotik	Disk antibiotik	Kriteria diameter zona inhibisi (mm)		
			S	I	R
1	$\beta$ lactam or $\beta$ lactamase inhibitor combinations	20/10 $\mu$ g amoxicillin-clavulanic acid	$\geq 20$	14-17	$\leq 13$
2	Cephalosporins	30 $\mu$ g cefotaxime	$\geq 26$	23-25	$\leq 22$
3	Fluorquinolones	5 $\mu$ g ciprofloxacin	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
4	Phenicol	30 $\mu$ g chloramphenicol	$\geq 18$	13-17	$\leq 12$
5	Cotrimoxazol	1,25/23,75 $\mu$ g trimethoprim-sulfamethoxazole	$\geq 16$	11-15	$\leq 10$
6	Aminoglycosides	10 $\mu$ g gentamicin	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$



#### 4.8 Alur penelitian



#### 4.9 Pengolahan dan 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  $p < 0,05$ .

#### 4.10 Etika penelitian

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

#### 4.11 Jadwal penelitian

**Tabel 6.** Jadwal penelitian

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