

## **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 dilakukan di Posyandu dan/atau Playgrup yang berada di wilayah Kecamatan Gayamsari dan Kecamatan Gunungpati Kota Semarang.
2. Identifikasi mikrobiologi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

##### 4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dan pengumpulan data akan 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 balita di Kotamadya Semarang.

### 4.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah balita di Kecamatan Gayamsari dan Gunungpati Semarang.

### 4.4.3 Sampel

Sampel adalah apusan nasofaring dari balita di Kecamatan Gayamsari dan Gunungpati Semarang yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

#### 4.4.3.1. Kriteria inklusi

- a. Anak usia 6 bulan sampai dengan 5 tahun yang hadir saat pengambilan data dan bersedia diikutkan dalam penelitian setelah diberi *informed consent* kepada orangtua.
- b. Tidak ada riwayat mengkonsumsi antibiotik dalam 2 hari terakhir
- 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 uji hipotesis terhadap dua proporsi:

$$n_1 = n_2 = \frac{(z_\alpha \sqrt{2PQ} + z_\beta \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$$n_1 = n_2 = \frac{(1,645 \sqrt{2 \times 0,145 \times 0,855} + 0,842 \sqrt{0,07 \times 0,93 + 0,22 \times 0,78})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$$n_1 = n_2 = 68$$

$P_1$  = proporsi kolonisasi *Klebsiella sp.* (penelitian oleh Irwanti) = 0,07

$P_2$  = 0,22 (berdasar estimasi peneliti sebesar 0,15% lebih tinggi dari  $P_1$ )

$P = 1/2(P_1 + P_2) = 0,145$

$Q = 1 - P$  ;  $Q_1 = 1 - P_1$  ;  $Q_2 = 1 - P_2$

$\alpha$  = tingkat kemaknaan = 0,05 ;  $\beta = 0,8$

$z_\alpha$  = derivat baku normal  $\alpha = 1,645$

$z_\beta$  = derivat baku normal  $\beta = 0,842$

Sampel minimal tiap kecamatan adalah 68 balita. Jadi total sampel minimal adalah 136 balita.

### 4.5 Variabel Penelitian

#### 4.5.1 Variabel bebas

1. Lokasi tempat tinggal
2. Higiene makanan
3. Higiene air
4. Paparan lansia
5. Riwayat antibiotik 3 bulan terakhir

#### 4.5.2 Variabel tergantung

Kolonisasi bakteri *Klebsiella sp.* pada nasofaring

#### 4.6 Definisi operasional variabel

Nama variabel	Defisi Operasional	Skala	Kategori penilaian
Lokasi tempat tinggal	<p>Tempat tinggal balita sehari- hari.</p> <p>Balita yang berada di tengah kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu atau PAUD di Kecamatan Gayamsari.</p> <p>Balita yang berada di pinggir kota yaitu balita yang mengikuti Posyandu atau PAUD di Kecamatan Gunungpati.</p>	Nominal	<p>a. Tempat tinggal balita berada dalam wilayah Kecamatan Gayamsari = 0</p> <p>b. Tempat tinggal balita berada dalam wilayah Kecamatan Gunungpati =1</p>
Higiene makanan	<p>Kebersihan sumber makanan sehari-hari baik untuk makan pagi, makan siang, makan malam, maupun makanan ringan yang dikonsumsi oleh sampel penelitian dengan rincian sebagai berikut : dimasak dirumah, restoran, warung/kantin, dan penjaja keliling.</p> <p>Data diukur menggunakan kuesioner pada orangtua.</p>	Nominal	<p>a. Baik (Sumber makanan yang paling sering dikonsumsi oleh sampel berasal dari masakan rumah dan restoran) = 0</p> <p>b. Tidak baik (Sumber makanan yang paling sering dikonsumsi oleh sampel berasal dari warung/kantin dan penjaja keliling) = 1</p>
Higiene air	<p>Higienitas sumber air untuk memasak, minum, dan mandi dari sumber air tertutup.</p> <p>Data diukur menggunakan kuesioner pada orangtua.</p>	Nominal	<p>a. Baik (Sumber air yang sering digunakan oleh sampel berasal dari air ledeng/ kemasan) = 0</p> <p>b. Tidak baik (Sumber air yang sering digunakan oleh sampel selain dari air ledeng/ kemasan) = 1</p>

Paparan lansia	<p>Paparan dengan orang lanjut usia (&gt;65 tahun) dalam satu rumah.</p> <p>Data diukur menggunakan kuesioner pada orangtua.</p>	Nominal	<p>a. Tidak ada kontak dengan lansia dalam satu rumah= 0</p> <p>b. Terdapat kontak dengan lansia dalam satu rumah =1</p>
Riwayat antibiotik 3 bulan terakhir	<p>Riwayat konsumsi/minum antibiotik selama 3 bulan terakhir.</p> <p>Data diukur menggunakan kuesioner pada orangtua</p>	Nominal	<p>a. Tidak mengkonsumsi antibiotik selama 3 bulan terakhir = 0</p> <p>b. Pernah mengkonsumsi antibiotik selama 3 bulan terakhir = 1</p>
Kolonisasi bakteri <i>Klebsiella sp.</i> pada nasofaring	<p>Didapatkan hasil kultur dan uji biokimia positif bakteri <i>Klebsiella sp.</i> dari hasil swab nasofaring balita.</p> <p>Kultur dilakukan pada media Agar Darah dan Mac Conkey . Uji biokimia dilakukan menggunakan media TSIA dan media semisolid.</p> <p>Kultur <i>Klebsiella sp.</i> pada media Mac Conkey tampak koloni berwarna merah muda dan mukoid.</p> <p><i>Klebsiella sp.</i> pada TSIA menunjukkan perubahan warna menjadi warna kuning pada <i>slant</i> maupun <i>butt</i> dan dijumpai adanya gas. Pada media semisolid, <i>Klebsiella sp.</i> tidak menunjukkan adanya pertumbuhan disekitar inokulum</p>	Nominal	<p>a. Pertumbuhan negatif <i>Klebsiella sp.</i> pada pemeriksaan di laboratorium = 0</p> <p>b. Pertumbuhan positif <i>Klebsiella sp.</i> pada pemeriksaan di laboratorium = 1</p>

## 4.7 Cara Pengumpulan data

### 4.7.1 Bahan

- Media Agar Darah
- Media Mac Conkey
- Media TSI Agar
- Media SIM (*Sulfide Indol Motility*)
- Reagen untuk pengecatan kapsul

### 4.7.2 Alat

- Kuesioner
- Alat swab nasofaring
- Inkubator
- Osse
- Deck glass dan kaca objek
- Tabung reaksi
- Cawan petri

### 4.7.3 Jenis Data

Data yang digunakan adalah data primer berupa kuesioner dan hasil pemeriksaan laboratorium mikrobiologi dari balita yang menjadi sampel penelitian.

### 4.7.4 Cara Kerja

#### 4.7.4.1. Cara pengambilan sampel

Apusan nasofaring diambil menggunakan alat swab khusus nasofaring. Subyek dalam posisi menengadah, kepala subyek difiksasi

dengan memegang dahi atau dagu subyek. Langkah selanjutnya swab dimasukkan ke dalam hidung dengan arah mendatar sampai dinding posterior nasofaring, kemudian swab diputar tiga kali atau selama 5 detik. Setelah apusan diambil, alat swab kemudian dimasukkan ke dalam media transport STGG. Tiap media transport diberi kode sesuai dengan nama subyek dan tanggal pengambilan.<sup>8,69</sup>

#### 4.7.4.2. Isolasi Primer

Isolasi primer dilakukan pada media Agar Darah dan Mac Conkey. Isolasi primer dikerjakan dengan *Streak-Plate technique*. Pada dasar cawan petri dibuat 3 daerah dengan spidol. Ujung alat swab digoreskan pada media Mac Conkey dan Agar Darah kurang lebih seluas 2 cm<sup>2</sup> pada daerah I. Osse disterilkan, lalu bekas goresan ujung alat swab tadi digoreskan pada daerah II media Mac Conkey dan Agar Darah dengan goresan yang rapat dan seterusnya hingga daerah III. Osse kembali disterilkan, cawan petri ditutup kemudian diberi kode, yaitu nama subyek dan tanggal inkubasi. Media dieramkan pada inkubator dengan CO<sub>2</sub> 5%, suhu 35° C selama 24 jam. Koloni *Klebsiella sp.* pada media Agar Darah bersifat gama-hemolisis, sedangkan pada media Mac Conkey koloni *Klebsiella sp.* tampak berwarna merah muda mukoid.<sup>8,15,33</sup>

#### 4.7.4.3. Identifikasi Bakteri

##### Uji biokimiawi pada media TSIA

Koloni murni pada media Agar Darah/Mac Conkey diambil menggunakan jarum osse kemudian ditusuk pada bagian *butt* dan

digores pada permukaan *slant* 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. Hasil positif bakteri *Klebsiella sp* yaitu warna media TSIA menjadi kuning pada bagian *slant* dan *butt*, dapat dijumpai gas, dan tidak terbentuk H<sub>2</sub>S.<sup>41</sup>

#### Uji motilitas

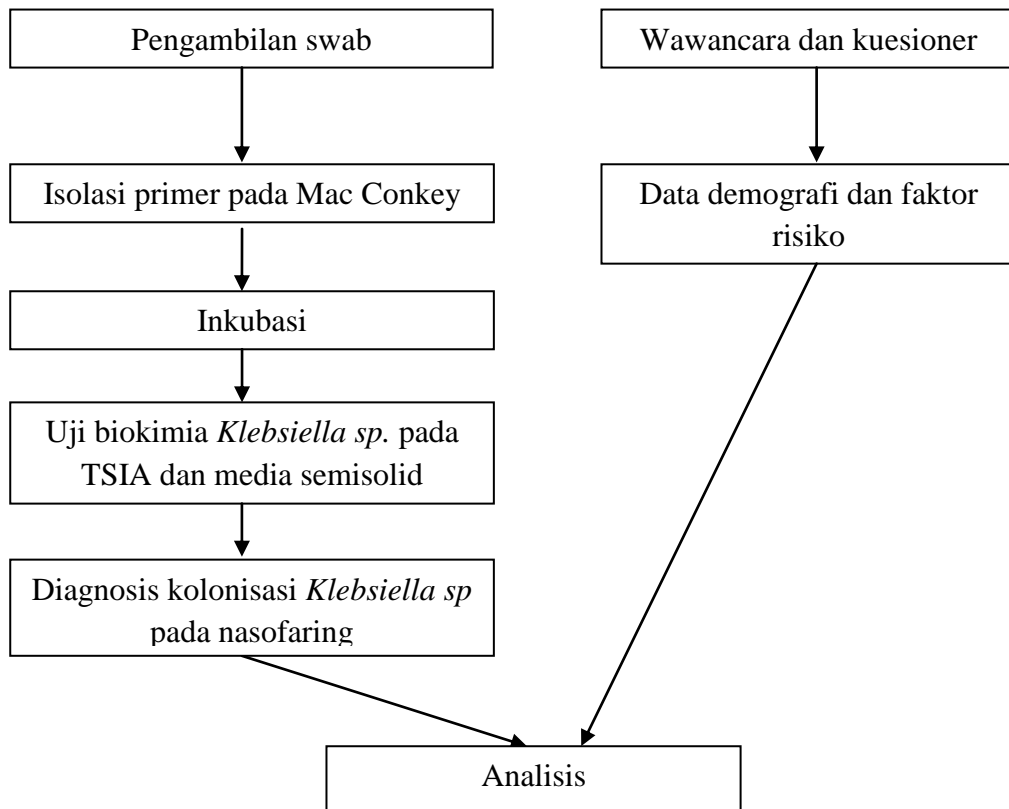
Koloni murni pada media Agar Darah/Mac Conkey diambil dengan menggunakan jarum osse. Jarum ose kemudian ditusukkan secara tegak lurus ke dalam tabung yang mengandung media SIM (*sulfide indol motility*). Kemudian diamati perubahan yang terjadi disekitar tusukan jarum tersebut. *Klebsiella sp.* yang memiliki sifat nonmotil hanya tumbuh pada garis inokulum dan tidak terbentuk cincin merah saat ditetesi reagen Kovac.<sup>33</sup>

#### Pengecatan kapsul

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 itu diperiksa dibawah mikroskop. Bakteri *Klebsiella sp.* akan berwarna dengan latar belakang berwarna gelap sedangkan kapsul tidak tercatat karena sukar mengikat warna.



#### 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, dan multivariat.

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  $p < 0,05$ . Jika hasil analisis bivariat ada yang bernilai  $p < 0,25$  diteruskan dengan analisis multivariat yaitu regresi logistik. Besarnya pengaruh faktor risiko dihitung menggunakan RP (rasio prevalensi) dan CI 95% (confidence interval).

#### 4.10 Etika Penelitian

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK)

Fakultas Kedokteran UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang pada tanggal 1 Mei 2013.

Jadwal penelitian adalah sebagai berikut dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan						
	1	2	3	4	5	6	7
Penyusunan proposal	■	■					
Ujian Proposal		■					
Persiapan media, alat penelitian			■	■			
Pengurusan ijin penelitian			■	■			
Pengambilan sampel					■	■	■
Wawancara dan kuesioner					■	■	■
Identifikasi bakteri					■	■	■
Analisa Hasil						■	■
Pembuatan laporan akhir							■