

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Disiplin ilmu yang terkait dalam penelitian ini adalah Ilmu Mikrobiologi dan Ilmu Bedah.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

4.2.1 Tempat penelitian

1. Pengambilan data berupa sampel swab kulit dan kuesioner pasien praoperatif di RSUP Dr Kariadi 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 Juni 2015

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 pada penelitian ini adalah pasien praoperatif di RSUP Dr Kariadi Semarang

4.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah pasien praoperatif di bangsal bedah yang menjalani operasi pada bulan Mei - Juni 2015

4.4.3 Sampel

Sampel adalah pasien bangsal bedah di RSUP Dr Kariadi yang telah dipilih yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

4.4.3.1 Kriteria inklusi :

- a. Pasien dewasa yang menjalani operasi elektif bersih atau bersih terkontaminasi yang menginsisi kulit.
- b. Setuju untuk menjawab pertanyaan dalam kuesioner dan diambil swab kulit dua jam praoperatif

4.4.3.2 Kriteria eksklusi :

Terdapat infeksi kulit atau jaringan lunak pada tubuh pasien

4.4.4 Cara sampling

Pemilihan subyek dengan menggunakan sistem *consecutive sampling*

4.4.5 Besar sampel

Besar sampel dihitung untuk uji hipotesis pada proporsi dalam satu populasi sebagai berikut.⁹⁷

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha}\sqrt{P_o(1-P_o)} + Z_{1-\beta}\sqrt{P_a(1-P_a)})^2}{(P_a - P_o)^2}$$

$$n = \frac{(1,64\sqrt{0,5(1-0,5)} + 0,842\sqrt{0,66(1-0,66)})^2}{(0,66-0,5)^2} = 58$$

Jumlah sampel minimal (n) adalah 58 pasien

n = perkiraan besar sampel

α = ditetapkan sebesar 0,05 (tingkat kepercayaan yang dikehendaki sebesar 95%)

β = ditetapkan sebesar 0,2 (nilai *power* 80%)

Z_α = deviat baku normal untuk α yaitu 1,645

Z_β = deviat baku normal untuk β yaitu 0,842

P_o = proporsi awal tidak diketahui, maka dipergunakan $P_o = 0,5$ ⁹²

$P_a = 0,66$ berdasarkan estimasi peneliti sebesar 0,16 (16%) lebih tinggi dari P_o

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

1. Usia
2. Kebiasaan merokok
3. Higiene personal
4. Lama perawatan praoperatif

4.5.2 Variabel tergantung

Kolonisasi *S. aureus*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* dan *Klebsiella sp.* pada kulit pasien praoperatif.

4.5.3 Variabel perancu

Status gizi, jenis pekerjaan, penggunaan antibiotik, jenis kelamin

4. 6 Definisi operasional variabel

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Skala	Kategori penilaian
Usia	Umur responden saat dilakukan penelitian, data diambil dari kuesioner	Nominal	a. Usia lebih atau sama dengan 65 tahun = 0 b. Usia kurang dari 65 tahun = 1
Kebiasaan merokok	Riwayat seseorang masih merokok aktif atau tidak. Data diambil menggunakan kuesioner	Nominal	a. Tidak mempunyai kebiasaan merokok = 0 b. Mempunyai kebiasaan merokok = 1

Tabel 2. Definisi operasional (lanjutan)

Variabel	Definisi operasional	Skala	Kategori penilaian
Higiene personal	Kebersihan pribadi. Data diukur menggunakan kuesioner higiene kulit yang telah diuji validitas dan reliabilitas. Kategori baik atau buruk ditetapkan dengan menggunakan ROC (<i>Receiver Operating Curve</i>)	Nominal	a. Baik = 0 b. Buruk = 1
Lama perawatan praoperatif	Lama hari pasien dirawat di rumah sakit sebelum dilakukannya operasi. Data diambil dari kuesioner	Nominal	a. Pasien dirawat kurang atau sama dengan 2 hari = 0 b. Pasien dirawat >2 hari = 1
Kolonisasi bakteri patogen	Didapatkan pertumbuhan kultur dan identifikasi uji biokimia positif bakteri <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Nominal	a. Pertumbuhan negatif pada pemeriksaan kultur = 0 b. Pertumbuhan positif pada pemeriksaan kultur = 1

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

- a. Media transport BHI
- b. Media inkubasi primer
 - Media *blood agar*
 - Media *mannitol salt agar* (MSA)
 - Media mac conkey
- c. Pengecatan gram
 - Gram A (kristal violet)
 - Gram B (Iodin)
 - Gram C (etil alkohol)
 - Gram D (safranin)
 - Aquadest
- d. Reagen tes katalase
 - H₂O₂ 3%
- e. Reagen tes koagulase
 - Plasma kelinci
 - saline
- f. Uji TSIA
 - Media *triple sugar iron agar* (TSIA)
- g. Media dan reagen tes IMVICMU
 - Reagen kovac

- Media air pepton
- Reagen metil merah
- Media air pepton glukosa fosfat
- Reagen alfa naphthol
- KOH 4%
- Media simon sitrat
- Indikator *brom timol blue* (BTB)
- Media semisolid
- Media urease broth

4.7.2 Alat

- Kuesioner
- Lidi kapas steril
- Oase
- Bunsen + kawat kasa
- Inkubator
- Deck glass dan kaca objek
- Tabung reaksi
- Cawan petri

Kuesioner yang akan dipakai untuk menentukan higiene personal disusun oleh peneliti. Validitas diuji dengan cara validasi *expert*. Uji realibitas dilakukan dengan metode *test-retest* dan kesesuaiannya diuji dengan *kappa*.

4.7.3 Jenis data

Data yang digunakan adalah data primer dari pasien praoperatif dengan menggunakan kuesioner.

4.7.4 Cara kerja

a. Cara pengambilan sampel (swabbing)

Apusan kulit diambil menggunakan cotton bud steril atau lidi kapas steril 2 jam sebelum pelaksanaan operasi. Ujung lidi kapas steril dibasahi dengan larutan saline steril, kemudian lidi kapas dihapuskan pada daerah kulit yang direncanakan akan dilakukan irisan operasi. Alat swab dimasukkan ke dalam media transport. Setiap media diberi kode dengan nama subjek dan tanggal pengambilan.

b. Isolasi bakteri

Isolasi primer dengan penanaman pada media agar darah, MSA dan mac conkey dengan metode streak plate. Media dibagi menjadi empat kuadran. Spesimen diambil menggunakan osse steril kemudian digoreskan pada kuadran I. Osse dibakar hingga membara kemudian goreskan lagi pada kuadran kedua. Begitu seterusnya hingga kuadran IV. Media diinkubasi lalu diamati koloni yang terbentuk. Inkubasi pada suhu 35° selama 48 jam. Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap 24 jam.

c. Pengecatan Gram

Mempersiapkan kaca objek yang bersih dan bebas lemak. Memanaskan ose kemudian mengambil bakteri lalu mengoleskan ke kaca objek. Apusan tersebut kemudian difiksasi dengan memanaskan kaca objek. Teteskan larutan gram A (kristal violet) hingga menutupi seluruh apusan. Menunggu 5 menit kemudian diirigasi dengan air mengalir. Larutan gram B (lugol) ditetaskan hingga menutupi seluruh apusan. ditunggu 45-60 detik kemudian setelah larutan lugol dibuang, diirigasi dengan alkohol selama 30 detik. Gram D ditetaskan. Ditunggu selama 1 menit kemudian irigasi dengan air mengalir, dikeringkan lalu diamati pada mikroskop.

d. Tes Katalase

Dengan ose steril, mengambil sedikit koloni kuman dari media kemudian meletakkan pada kaca objek. meneteskan satu tetes H_2O_2 3% pada koloni di kaca objek. Amati terbentuknya gelembung. Hasil tes katalase positif bila terbentuk gelembung.

e. Tes Koagulase

Larutan salin ditetaskan pada kaca objek. Koloni diambil menggunakan ose steril kemudian diemulsikan dengan tetesan salin. Plasma ditetaskan di samping emulsi. Plasma dicampurkan dengan emulsi. Terbentuknya gumpalan diamati setelah 10 detik. Hasil positif bila terdapat gumpalan.

f. TSIA

Koloni bakteri diambil dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan kemudian ditusukkan pada bagian tengah medium hingga ke bawah. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C.

h. Indol Tes

Media diinokulasi dengan sejumlah kecil kultur murni kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam. Untuk menguji produksi indol, 5 tetes reagen kovacs ditambahkan ke dalam tabung. Indol positif jika terdapat lapisan cincin berwarna merah. *E. coli* merupakan bakteri dengan indol positif. Sedangkan *Enterobacter sp.* dan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella sp.* merupakan indol negatif.

h. Tes metil red dan voges preskauer

Bakteri diinokulasi pada media dengan metode aseptik kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Lima tetes reagen metil red ditambahkan, jika berubah warna menjadi merah menunjukkan hasil positif.

Pada tes voges proskauer bakteri diinokulasi pada media kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil positif bila terbentuk warna merah.

i. Tes Sitrat

Koloni bakteri diinokulasi kedalam medium siimon citrat agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Jika bakteri yang diuji dapat menggunakan sitrat maka medium akan berubah warna dari hijau ke biru.

j. Tes Motilitas

Organisme ditusuk kedalam medium menggunakan kawat inokulasi. Organisme motil akan berdifusi keluar dari garis inokulasi dengan warna pink, keruh sepanjang medium. Organisme nonmotil hanya tumbuh sepanjang garis inokulasi.

k. Tes urease

Bakteri diinokulasi pada media ureasebroth menggunakan kawat inokulasi. Kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37° C. Hasil identifikasi dari masing-masing bakteri dapat dilihat sebagai berikut pada Tabel 3

Tabel 3. Identifikasi bakteri ⁹⁸⁻¹⁰⁰

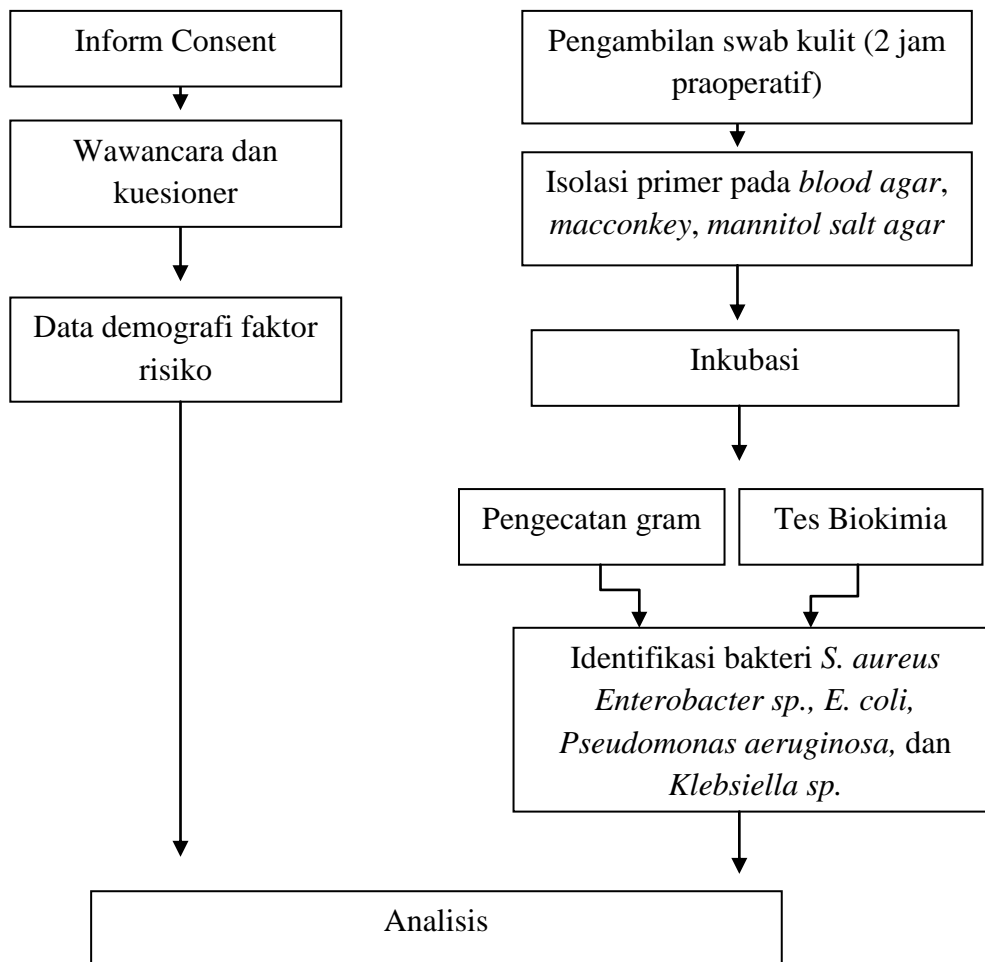
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
Blood agar	Koloni 3-5 mm dalam 24 jam, 3-8 mm dalam 3 hari, krem kekuningan hingga jingga, halus, sedikit meninggi dengan zona transparan di sekitar koloni (beta hemolisis)	Koloni 2-3 mm, opak, abu-abu, basah, hemolisis/non on hemolisis	Koloni 3-4mm putih keabuan, halus, non hemolisis	Koloni 3-5mm kilau metalik, dengan zona transparan di sekitar (hemolisis beta)	Koloni 3-4mm, abu-abu, mukoid, non hemolisis
MSA	Tumbuh koloni 3-5 mm, warna media berubah menjadi kuning	TD	TD	TD	TD

Tabel 4. Identifikasi bakteri (lanjutan)

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>	<i>Pseudomona</i> <i>s sp</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
Mac Conkey	Koloni 0,1- 0,5mm,merah h muda	Koloni 2- 3mm merah muda kering	Koloni 2- 4mm, merah muda sedikit mukoid	Koloni 3-5 mm dan media tidak berwarna	Koloni 3-4 mm, merah muda, mukoid
Pengecat an gram	Kokus gram positif berwarna ungu, berbentuk seperti buah anggur	Batang gram negatif berwarna merah	Batang gram negatif berwarna merah	Batang gram negatif berwarna merah	Batang gram negatif berwarna merah
Uji katalase	Positif	positif	positif	Positif	Positif
Uji koagulase	Positif	TD	TD	TD	TD
TSIA	TD	Asam/asam , gas positif	Asam/asam, gas positif	Alkali/alkali	Asam/asam, gas positif
Tes indol	TD	Positif	negatif	Negatif	Negatif
Tes Metil merah	TD	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
Tes Voges preskauer	TD	Negatif	Positif	Negatif	Positif
Tes sitrat	TD	Negatif	Positif	Positif	Positif
Tes motilitas	TD	Positif	Positif	Positif	Negatif
Tes urease	TD	Negatif	Negatif	Negatif	Positif

Keterangan, TD = tidak dilakukan

4.8 Alur penelitian



Gambar 3. Alur peneliltian

4.9 Pengelolaan dan analisis data

Pengolahan data dilakukan dengan beberapa tahapan, editing yaitu data yang telah dikumpulkan dikoreksi dan diperiksa. *Coding*, yaitu pemberian kode pada tiap-tiap data sesuai dengan kriteria masing-masing variabel. *Tabulasi* yaitu proses menempatkan data dalam bentuk tabel.

Analisis data dengan SPSS for Windows menggunakan uji *chi square* bila syarat tidak terpenuhi akan dilakukan uji alternatif *Fischer exact test*. Data dianalisis dengan analisis deskriptif, bivariat dan multivariat.

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, dalam Tabel 4

Tabel 4. 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						