

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, catatan medis dan kuesioner di bangsal bedah RSUP dr Kariadi.
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 penelitian observasional analitik dengan pengambilan data secara *cross sectional*.

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi Target

Populasi target penelitian ini adalah pasien praoperatif yang dirawat di bangsal bedah RSUP dr Kariadi.

4.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah pasien praoperatif yang dirawat di bangsal bedah RSUP dr Kariadi yang telah dipilih.

4.4.3 Sampel

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

4.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Pasien praoperatif dewasa dengan operasi bersifat elektif yang memotong kulit, kategori operasi bersih dan operasi bersih terkontaminasi.
- b. Pasien setuju untuk menjawab pertanyaan kuesioner sendiri dan diambil swab kulit 2 jam praoperatif.

4.4.3.2 Kriteria Eksklusi

Terdapat lesi atau infeksi pada kulit atau jaringan lunak pada tubuh pasien praoperatif.

4.4.4 Cara sampling

Pemilihan subjek dilakukan dengan menggunakan metode *consecutive sampling*.

4.4.5 Besar sampel

Besar sampel dihitung untuk uji hipotesis pada proporsi dalam 1 populasi sebagai berikut:¹⁴⁹

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha}\sqrt{P_0(1-P_0)} + Z_{1-\beta}\sqrt{P_a(1-P_a)})^2}{(P_a - P_0)^2}$$

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_0 = proporsi awal tidak diketahui, maka dipergunakan $P_0 = 0,5$.¹⁴⁹

P_a = 0,66 berdasarkan estimasi peneliti sebesar 0,16 (16%) lebih tinggi dari P_0 .

$$n = \frac{(1,645\sqrt{0,5(1-0,5)} + 0,842\sqrt{0,66(1-0,66)})^2}{(0,66 - 0,5)^2} = 58$$

Jumlah perkiraan besar sampel (n) adalah 58 pasien.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

1. Jenis kelamin
2. Penyakit diabetes melitus
3. Status gizi
4. Riwayat penggunaan antibiotik 3 hari terakhir

4.5.2 Variabel terikat

Kolonisasi bakteri patogen penyebab IDO pada kulit (*S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*).

4.5.3 Variabel perancu

Usia, *site*, kebiasaan merokok, lama perawatan praoperatif, higien personal, dan pekerjaan.

4.6 Definisi operasional

Definisi operasional sesuai Tabel 3.

Tabel 3. Definisi operasional.

Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala	Kategori Penilaian
Jenis Kelamin	Jenis Kelamin diperoleh dari registrasi rumah sakit.	Nominal	a. Perempuan = 0 b. Laki laki = 1
Penyakit Diabetes Melitus	Ada tidaknya penyakit diabetes melitus pada pasien. Data diperoleh dengan menggunakan kuesioner dan melihat catatan medis.	Nominal	a. Tidak ada penyakit diabetes melitus = 0 b. Ada penyakit diabetes melitus = 1
Status Gizi	Penilaian status gizi pasien berdasarkan nilai Indeks Massa Tubuh (IMT). Data diperoleh dari pengukuran tinggi dan berat badan secara langsung pada pasien menggunakan alat ukur yang valid dan reliabel.	Nominal	a. Non-overweight = 0 (IMT \leq 25,0) b. Gizi lebih atau <i>overweight</i> = 1 (IMT \geq 5,0)
Riwayat penggunaan antibiotik 3 hari terakhir	Riwayat penggunaan antibiotik selama 3 hari terakhir diperoleh melalui kuesioner atau melihat catatan medis.	Nominal	a. Menggunakan antibiotik selama 3 hari terakhir = 0 b. Tidak menggunakan antibiotik selama 3 hari terakhir = 1
Kolonisasi bakteri potensial patogen penyebab IDO a. <i>S. aureus</i> . b. <i>E. coli</i> . c. <i>Enterobacter sp.</i> d. <i>Pseudomonas sp.</i> e. <i>Klebsiella sp.</i>	Didapatkannya pertumbuhan kultur dan identifikasi uji biokimia positif bakteri patogen penyebab IDO dari hasil swab kulit pada pasien praoperatif.	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. Isolasi primer
 1. *Blood agar*
 2. *Mannitol Salt Agar (MSA)*
 3. *Mac Conkey Agar (MCA)*
- b. Media transpor : *Brain Heart Infusion (BHI)*
- c. Reagen pengecatan gram
 1. Larutan kristal violet
 2. Lugol
 3. Alkohol absolut
 4. Safranin atau air fukhsin
- d. Reagen uji katalase
 1. Larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%
- e. Reagen uji koagulase
 1. Plasma kelinci
- f. Reagen dan media uji *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*
 1. TSIA
- g. Reagen dan media uji indol
 1. Media air pepton
 2. Reagen Kovac

- h. Reagen dan media uji MR dan uji voges proskauer
 - 1. Media air pepton glukosa
 - 2. Reagen MR
 - 3. Reagen voges proskauer (5% alfa naphtol dan 40% KOH)
- i. Reagen dan media uji sitrat
 - 1. Media Simmon Sitrat
 - 2. Reagen *Brom Thymol Blue* (BTB)
- j. Reagen dan media uji motilitas
 - 1. Media semisolid
- k. Reagen dan media uji urease
 - 1. *Urea broth*

4.7.2 Alat

- 1. Kuesioner
- 2. Alat untuk swab (lidi kapas steril)
- 3. Bunsen dan kawat kasa
- 4. Inkubator
- 5. Oase
- 6. Cawan petri
- 7. Deck *glass* dan kaca objek
- 8. Tabung reaksi
- 9. Mikroskop
- 10. Alat ukur berat badan dan tinggi badan di bangsal.

4.7.3 Jenis data

Data yang digunakan adalah data primer dari pasien praoperatif dengan kuesioner, apusan kulit, pengukuran tinggi dan berat badan, dan data sekunder dari rumah sakit menggunakan catatan medis.

4.7.4 Cara kerja

4.7.4.1 Cara pengambilan data

Informed consent dan pengambilan data pasien dilakukan oleh peneliti. Melakukan *informed consent* kepada pasien kemudian memulai perolehan data melalui wawancara menggunakan kuesioner yang telah disiapkan. Melakukan pengukuran tinggi badan dan berat badan pasien menggunakan alat ukur yang ada di bangsal yang telah teruji validitas dan realibilitasnya. Alat dianggap valid dan reliabel karena telah dilakukan peneraan secara berkala oleh instansi peralatan dan sarana (IPS) RSUP dr Kariadi.

4.7.4.2 Cara pengambilan sampel (*swabbing*)

Pengambilan sampel apusan kulit dilakukan oleh peneliti. Mengambil apusan kulit di daerah yang rencananya dilakukan tindakan operatif dengan menggunakan lidi kapas steril yang telah ditetesi larutan *saline* steril pada 2 jam sebelum jadwal operasi. Lidi kapas tersebut kemudian dimasukkan ke dalam media transpor. Setiap media transpor diberi kode dengan nama subjek dan tanggal pengambilan.

4.7.4.3 Isolasi primer

Menyiapkan media isolasi primer (*blood agar*, MSA, dan MCA) pada masing masing cawan petri kemudian menentukan 3 zona pada media (zona I, zona II, dan zona III). Cawan petri tersebut diberi label identitas yang berisi nama subjek dan tanggal pengambilan apusan. Lidi kapas dengan apusan kulit yang telah diambil sebelumnya digoreskan pada media isolasi. Menggunakan oase yang telah disterilkan, bekas goresan lidi kapas tadi digoreskan pada zona 1, kemudian pada zona II lalu zona III. Setiap melakukan goresan pada zona, oase disterilkan terlebih dahulu. Inkubasi dilakukan di dalam inkubator dengan CO₂ 5%, suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan pertumbuhan koloni dilakukan setiap 24 jam.¹⁴⁴

4.7.4.4 Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan oleh peneliti dengan melakukan pengecatan gram dan uji biokimia.

a. Pengecatan Gram

Mempersiapkan kaca objek yang bersih. Menggunakan oase yang telah disterilkan, bakteri dari media isolasi primer diambil lalu dioleskan pada kaca objek. Kaca objek tersebut kemudian dipanaskan kemudian setelah kering digenangi dengan larutan kristal violet selama 1 menit. Setelah pengecatan, kaca objek dialiri dengan air selama 2 detik. Kaca objek tersebut kemudian digenangi dengan larutan lugol dan ditunggu selama 1 menit kemudian setelah lugol dibuang dialiri dengan alkohol absolut selama 15 detik. Setelah tidak tampak warna pada alkohol yang mengalir, melakukan pengecatan kedua dengan safranin atau air fukshin tunggu selama 1 menit, kemudian dialiri dengan air. Setelah pengecatan

selesai, menunggu kaca objek hingga kering kemudian mengamati dengan mikroskop.^{128,130}

b. Uji katalase

Mempersiapkan kaca objek yang bersih. Menggunakan oase yang telah disterilkan, bakteri dari media isolasi primer diambil lalu dioleskan pada kaca objek. Kaca objek tersebut ditetaskan 1 tetes H₂O₂ 3% pada daerah olesan kemudian diamati adanya gelembung yang terbentuk. Hasil tes katalase positif jika terbentuk gelembung.¹³¹

c. Uji koagulase

Meneteskan larutan *saline* pada kaca objek. Dengan osse yang telah disterilkan, mengambil koloni dari media kultur kemudian mengemuliskan dengan tetesan saline pada kaca objek. Meneteskan plasma di samping emulsi kemudian mencampurkan plasme dengan emulsi. Mengamati ada atau tidak ada gumpalan yang terbentuk setelah 10 detik. Hasil tes koagulase positif jika terbentuk gumpalan.¹⁴⁵

d. Uji TSIA

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium hingga ke dasar tabung. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil fermentasi glukosa positif jika *slant* berwarna merah (alkali) dan *butt* berwarna kuning (asam). Hasil fermentasi laktosa dan atau sukrosa positif jika pada seluruh tabung (*slant* dan *butt*) berwarna kuning (asam). Hasil fermentasi yang menghasilkan gas positif jika terlihat retakan atau seluruh *slant* terangkat

dari dasar tabung. Hasil reduksi sulfur positif jika pada *slant* berwarna hitam. Reduksi sulfur terjadi hanya pada keadaan asam sehingga juga menunjukkan hasil positif pada fermentasi.¹³⁵

e. Uji Indol

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium (*urea broth*) hingga ke dasar tabung. Media dinkubasi pada suhu 35°C selama 24 - 48 jam. Menambahkan 5 tetes reagen Kovac ke dalam tabung. Hasil tes Indol positif jika terbentuk lapisan cincin berwarna merah.¹³⁹

f. Uji MR

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium (media air pepton glukosa sulfat) hingga ke dasar tabung. Media diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C kemudian menambahkan 5 tetes reagen MR. Hasil uji MR positif jika warna media menjadi merah.¹⁴⁰

g. Uji Voges Proskauer (VP)

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium hingga ke dasar tabung. Media diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C kemudian menambahkan 0,6 ml larutan alfa naphthol 5% dengan 0,2 ml KOH 40% dalam akuades pada media. Setelah mengocok tabung tersebut, memiringkan tabung dan dibaca dalam waktu 15 menit hingga 1 jam. Hasil uji VP positif jika terbentuk warna merah.¹⁴⁰

h. Uji sitrat

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium (simmon sitrat) hingga ke dasar tabung. Media diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil tes uji sitrat positif jika terdapat perubahan warna dari hijau menjadi biru.¹⁴¹

i. Uji motilitas

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium (media semisolid) hingga ke dasar tabung. Hasil uji motilitas positif jika tampak kekeruhan sepanjang garis inokulasi membentuk pohon cemara terbalik (bakteri berdifusi keluar dari garis inokulasi).¹⁴²

j. Uji urease

Mengambil koloni bakteri dengan jarum inokulasi lurus yang telah disterilkan, kemudian menusukkan jarum tersebut pada bagian tengah medium (urea *broth*) hingga ke dasar tabung. Media diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil uji urease positif akan tampak warna merah muda pada media.¹⁴³

k. Hasil identifikasi

Hasil isolasi primer sesuai Tabel 4. Hasil identifikasi bakteri sesuai Tabel 5.

Tabel 4. Hasil isolasi primer.^{30-32,128}

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	<i>Klebsiella</i> <i>sp</i>
BA	1-3 mm Kuning Beta hemolisis	2-3 mm Abu abu Gamma hemolisis.	2-3 mm Abu abu Gamma hemolisis	2-4 mm Hijau Beta hemolisis	2-3 mm Abu abu Gamma hemolisis
MSA	1-3 mm Merah muda Fermentasi mannitol (+)	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
MAC	1-3 mm Merah tua Fermentasi laktosa (+)	2-3 mm Merah muda Halo (+) Fermentasi laktosa (+)	2-3 mm Merah muda Halo (-) Fermentasi laktosa (+)	2-3 mm Kuning Fermentasi laktosa (-)	2-3 mm Merah muda Halo (-) Fermentasi laktosa (+)

(+) = positif, (-) = negatif, (X) = tidak dikerjakan

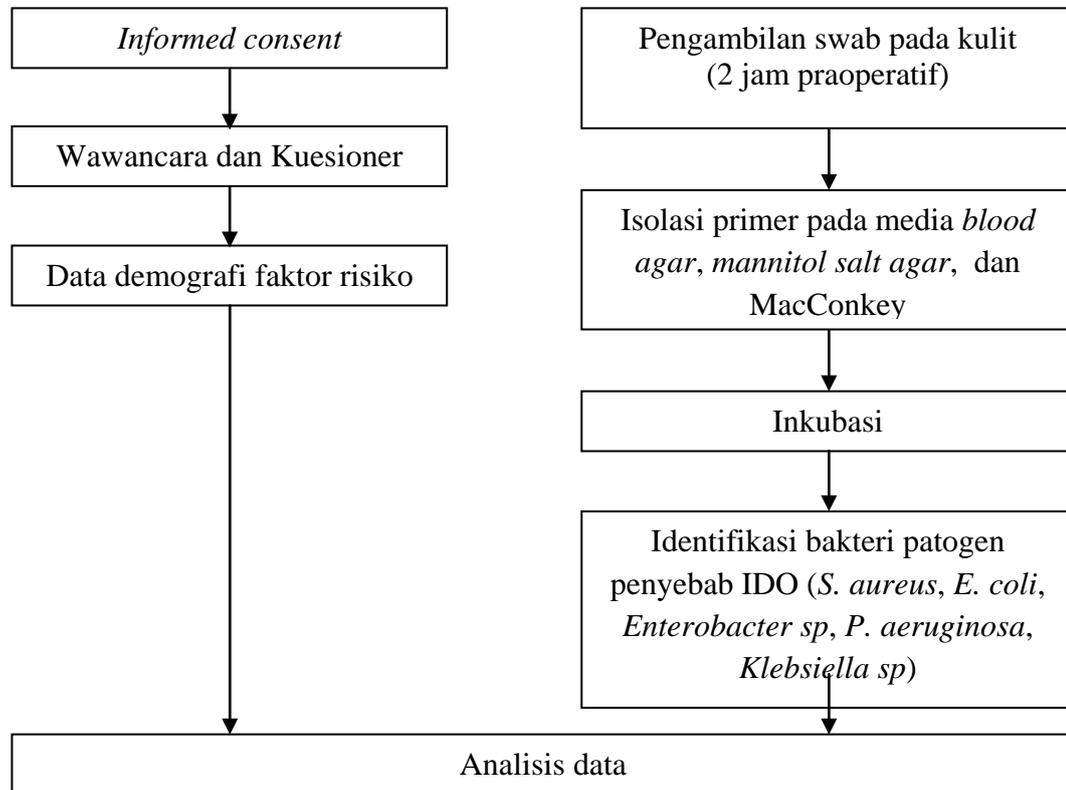
Tabel 5. Hasil identifikasi bakteri.^{30-32,128}

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>
Gram	Kokus Gram (+)	Batang Gram (-)	Batang Gram (-)	Batang Gram (-)	Batang Gram (-)
Katalase	+	X	X	X	X
Koagulase	+	X	X	X	X
TSIA	X	Asam / Asam Gas (+) H ₂ S (-)	Asam / Asam Gas (+) H ₂ S (-)	Alkali / Alkali Gas (-) H ₂ S (-)	Asam / Asam Gas (+) H ₂ S (-)
Indol	X	+	-	-	-
MR	X	+	+	-	-
VP	X	-	-	-	+
Sitrat	X	-	-	+	+
Motilitas	X	+	+	+	-
Urease	X	-	+	-	+

(+) = positif, (-) = negatif, (X) = tidak dikerjakan

4.8 Alur penelitian

Alur penelitian sesuai dengan Gambar 25



Gambar 25. Alur penelitian.

4.9 Analisis data

Pengolahan data dilakukan dengan tahap editing, coding, tabulasi dan analisis data menggunakan SPSS for Windows. Data dianalisis dengan analisis deskriptif, bivariat dan multivariat. Analisis data bivariat menggunakan uji *chi square* / *fischer exact test*.

4.10 Etika Penelitian

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

4.11 Jadwal penelitian

Jadwal penelitian sesuai Gambar 26.

Kegiatan	Bulan						
	1	2	3	4	5	6	7
Penyusunan proposal							
Ujian proposal							
Pengambilan sampel							
Wawancara dan kuesioner							
Penelitian di laboratorium							
Analisa hasil							
Pembuatan laporan akhir							
Ujian hasil							

Gambar 26. Jadwal penelitian