BAB IV
METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan terhadap sekumpulan objek yang biasanya betujuan untuk melihat gambaran fenomena yang terjadi di dalam suatu populasi tertentu (Notoatmojo, 2012). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menggambarkan angka kuman dan jenis bakteri pada swab tangan paramedis di ruang NICU RSUD Badung Mangusada (Notoatmojo, 2012).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengambilan sampel swab tangan dilakukan di ruang NICU RSUD Badung Mangusada dan tahap pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu pengambilan sampel dan pemeriksaan sampel untuk pemeriksaan ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2018.

C. Populasi, Besar Sampel, Kriteria Sampel dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tenaga paramedis di RSUD Badung Mangusada.

2. Besar sampel penelitian

Dalam penelitian ini yang menjadi sampel adalah tenaga paramedis di ruang NICU RSUD Badung Mangusada. Berdasarkan data yang diperoleh dari RSUD Badung Mangusada, jumlah petugas kesehatan di ruang NICU sebanyak 23 orang sehingga dilakukan teknik sampling jenuh. Menurut Sugiyono (2011), dalam sampling jenuh bila jumlah populasi relatif kecil, kurang dari 30 orang maka semua anggota populasi digunakan sebagai sampel. Besar sampel berdasarkan teknik sampling jenuh, maka semua tenaga paramedis yang bersedia menjadi responden dijadikan sampel.

3. Kriteria sampel

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi adalah kriteria atau ciri-ciri yang perlu dipenuhi oleh setiap anggota populasi yang dapat diambil sebagai sampel (Notoatmojo, 2012). Dalam penelitian ini kriteria inklusi yaitu :

1) Perawat dan bidan yang bersedia menjadi responden.
2) Perawat dan bidan yang sehat jasmani dan rohani.

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi adalah ciri-ciri anggota populasi yang tidak dapat diambil sebagai sampel (Notoatmojo, 2012). Dalam penelitian ini kriteria eksklusi yaitu:

1) Perawat dan bidan yang tidak bersedia menjadi responden.
2) Memiliki riwayat baru sembuh dari luka pada telapak tangan.
3) Memiliki riwayat alergi terhadap bahan pembersih tangan.

4. Teknik sampling

Pengambilan sampel (sampling) adalah proses memilih sejumlah elemen secukupnya dari populasi sehingga peneliti dapat menggeneralisasikan sifat atau karakteristik sampel pada elemen populasi (Noor, 2011). Teknik sampling merupakan teknik dalam pengambilan sampel (Sugiyono, 2011). Dalam penelitian ini, pengambilan sampel dilakukan dengan cara non probability secara sampling jenuh yaitu teknik penentuan sampel bila semua anggota populasi digunakan sebagai sampel (Sugiyono, 2011). Dalam penelitian ini semua tenaga paramedis di ruang NICU RSUD Badung Mangusada digunakan sebagai sampel.

D. Jenis, Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer yang dikumpulkan pada penelitian ini berupa kuisioner, dan hasil pemeriksaan laboratorium berupa angka kuman dan bakteri yang terindentifikasi pada swab tangan.

b. Data sekunder

Data sekunder yang dikumpulkan pada penelitian ini berupa data informasi dari RSUD Badung Mangusada yang diperlukan dalam melengkapi data penelitian, seperti jumlah tenaga kesehatan perawat dan bidan di ruang NICU RSUD Badung Mangusada dan kasus infeksi nosokomial.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan adalah dengan cara memberikan kuisioner kepada tenaga paramedis di ruang NICU RSUD Badung Mangusada, kemudian dilakukan swab tangan pada responden dan melakukan

pemeriksaan laboratorium untuk mengetahui angka kuman dengan metode hitung cawan dan identifikasi bakteri.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan untuk pengumpulan data pada penelitian ini adalah: *informed consent*, kuisioner, alat tulis, alat dokumentasi, alat dan bahan untuk pengambilan sampel swab tangan dan pemeriksaan laboratorium.

E. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kapas lidi steril, tabung reaksi (merk *Pyrex*), tabung durham, rak tabung reaksi, api bunsen, ose bulat, ose jarum, *spreader*, pinset, batang pengaduk, erlenmeyer (merk Pyrex), bola hisap, pipet ukur (merk *Pyrex*), mikropipet (merk Terumo), mikrotip, kaca objek, pipet tetes, pinset, jembatan pewarnaan, gelas beaker (merk Iwaki), gelas ukur (merk *Pyrex*) petridish, inkubator (merk *Esco Isotherm* dengan spesifikasi: volume 110 L (3.9 cu. ft), *range* suhu +7.5°C - 300°C, beban maksimal 30 kg, berat 75 kg, dimensi eksternal 710 x 587 x 785 mm, dimensi internal 560 x 400 x 490 mm)*)*, mikroskop binokuler (merk Olympus), *cool box*, *Bio Safety Cabinet (*merk Biobase), *hotplate*, *magnetic stirer*, neraca analitik (merk Radwag), *autoclave* (merk Tomy ES-215 dengan spesifikasi: *range* suhu sterilisasi 105 – 123^0C, *range* tekanan 0 - 127 kPa/max 147 kPa, sumber panas 1.5 kW, kapasitas *chamber* 248 x 543mm/25 ℓ, berat 50 kg, dimensi unit utama 400/460/920 mm), dan *Quibec Colony Counter*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain, *Natrium Chlorida* (NaCl) 0,9% media *Plate Count Agar* (PCA), media *Nutrient Agar* (NA) media gula-gula (glukosa, laktosa, maltosa, manitol dan sukrosa), media *Alkaline Peptone Agar* (APW), akuades steril, kertas pH, *Crystal Violet*, Lugol, Safranin, Alkohol 70%, indikator *Bromthymol Blue*, media *Mac Conkey Agar (*MCA*)*, media *Blood Agar Plate* (BAP), media *Manitol Salt Agar* (MSA), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Sulfide Indole Motility* (SIM), Media *Simmons Citrate* (SC), Media *Methyl Red/Voges Proskauer*, indikator *Methyl Red*, reagen Katalase, plasma sitrat, reagen *Kovac*, reagen *barit* A, reagen *barit* B, kapas berlemak, aluminium foil, indikator tip dan kertas label.

3. Prosedur Kerja

a. Prosedur pengambilan sampel swab tangan

Pengambilan sampel swab tangan berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan oleh Zuhriyah (2004) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

1) Disiapkan alat dan bahan yang digunakan.
2) Responden diminta menggosok-gosok kedua telapak tangannya.
3) Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam larutan NaCl 0,9%.
4) Kapas lidi tersebut digunakan untuk men-swab seluruh permukaan tangan dan sela-sela jari.
5) Kapas lidi tersebut dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9%.
6) Larutan NaCl 0,9% dimasukkan ke dalam *coolbox* (jika akan dikirim ke tempat pemeriksaan).

7) Segera dilakukan inokulasi ke dalam media pertumbuhan.

b. Pemeriksaan laboratorium

1) Pemeriksaan Angka Kuman

Pemeriksaan angka kuman dengan metode sebar berdasarkan prosedur kerja dari buku Mikrobiologi Umum oleh Waluyo (2016) dan buku ajar Mikrobiologi oleh Radji (2010) sebagai berikut:

a) Inokulasi pada media PCA

(1) Disiapkan alat dan bahan

(2) Dihidupkan api bunsen.

(3) Difiksasi mulut tabung sebelum sampel diambil

(4) Dipipet sampel sebanyak 100 µm dengan menggunakan mikropipet dan dituangkan pada media PCA yang telah memadat.

(5) Sampel disebar dengan menggunakan *spreader*.

(6) Diinkubasi pada suhu 37 ^{0}C selama 24-48 jam.

b) Hitung koloni pada Media PCA

(1) Dihitung koloni yang tumbuh pada media PCA dengan menggunakan *colony counter*.

(2) Jumlah koloni yang sesuai syarat masuk hitungan adalah berjumlah 30-300 koloni dalam satu media.

2) Identifikasi bakteri gram negatif

Identifikasi bakteri gram positif berdasarkan prosedur kerja dari buku Manual Laboratorium Mikrobiologi oleh Cappucino and Sherman, (2009) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

a) Penanaman sampel (inokulasi) pada media MCA.

(1) Disiapkan alat dan bahan.

(2) Dimasukkan ose bulat ke dalam sampel swab pada NaCl 0,9% dan ditanam pada media MCA, digoreskan sebanyak 4 kuadran secara aseptis.

(3) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(4) Koloni yang tumbuh pada media pertumbuhkan diamati bentuk, warna, dan tekstur koloni.

b) Peremajaan isolat ke media NA

(1) Disiapkan alat dan bahan.

(2) Diambil satu koloni menggunakan ose bulan dari media MCA dan ditanam ke media NA, digoreskan sebanyak 4 kuadran secara aseptis.

(3) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(4) Koloni yang tumbuh pada media NA dilakukan uji biokimia.

c) Uji biokimia TSIA

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose jarum.

(2) Koloni tersebut ditusuk sekali pada bagian dasar media TSIA, lalu digoreskan pada media TSIA dibagian miringnya *(slant).*

(3) Hasil goresan diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam.

(4) Amati reaksi yang terjadi.

d) Uji biokimia gula-gula (glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa)

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose bulat.

(2) Koloni tersebut dimasukkan ke dalam media gula-gula dan dihomogenkan.

(3) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam.

(4) Diamati reaksi yang terjadi.

e) Uji biokimia SIM

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose jarum.

(2) Koloni tersebut ditusuk ke media SIM sedalam ± ¼ bagian (tidak sampai ke dasar).

(3) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam.

(4) Ditambahkan 250 µl reagen kovac dalam media kemudian kocok perlahan dan biarkan dalam posisi tegak.

(5) Diamati permukaan media.

f) Uji biokimia SC

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose bulat.

(2) Koloni tersebut ditaman ke media SC dengan teknik streak (goresan) dengan menggunakan ose bulat pada bagian miring.

(3) Hasil goresan diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam.

(4) Diamati reaksi yang terjadi.

g) Uji biokimia metil merah

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose bulat.

(2) Inokulasikan pada media metil merah dengan dihomogenkan.

(3) Inkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(4) Ditambahkan 6 tetes indikator metil merah

(5) Diamati reaksi yang terjadi.

(6) Uji biokimia *Voges-Proskauer*

(1) Satu koloni dari media NA diambil dengan menggunakan ose bulat.

(2) Inokulasikan pada media *Voges-Proskauer* dengan dihomogenkan.

(3) Inkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(4) Ditambahkan 12 tetes reagen barit A dan 6 tetes reagen barit B.

(5) Diamati reaksi yang terjadi.

3) Identifikasi bakteri gram positif

Identifikasi bakteri gram positif berdasarkan prosedur kerja dari buku Manual Laboratorium Mikrobiologi oleh Cappucino and Sherman, (2009) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

a) Penanaman sampel (inokulasi) pada media BAP.

(1) Disiapkan alat dan bahan.

(2) Dimasukkan ose bulat ke dalam sampel swab pada NaCl 0,9% dan ditanam pada media BAP, digoreskan sebanyak 4 kuadran secara aseptis.

(3) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(4) Koloni yang tumbuh pada media pertumbuhkan diamati bentuk, warna, dan tekstur koloni.

b) Pewarnaan gram

(1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.

(2) Kaca objek dibersihkan dengan tissue untuk menghilangkan lemak yang ada.

(3) Kaca objek difiksasi diatas bunsen dan diberi label.

(4) Diambil NaCl dengan ose dan diteteskan diatas kaca objek secukupnya.

(5) Diambil biakan koloni yang tumbuh pada media BAP lalu dibuat apusan pada objek hingga merata.

(6) Fiksasi pada api bunsen.

(7) Dilakukan pewarnaan dengan larutan warna *Crystal Violet* dan didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.

(8) Dilakukan pewarnaan dengan larutan Lugol dan didiamkan selama 1 menit. Lalu dibilas dengan air mengalir.

(9) Dilakukan pembersihan zat pengganggu dengan menggunakan alkohol 70% setetes demi setetes hingga aliran alkohol yang menetes hampir jernih. Lalu dibilas preparat dengan air mengalir.

(10) Dilakukan pewarnaan dengan larutan safranin dan didiamkan selama 45 detik kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan.

(11) Preparat yang sudah jadi diamati dengan mikroskop perbesaran lensa objektif 100x dengan penambahan oil emersi.

c) Uji katalase

(1) Koloni biakan bakteri yang tumbuh pada media BAP disiapkan.

(2) Reagen katalase sebanyak 1-2 ose ditempatkan di atas kaca objek.

(3) Diambil 1 koloni bakteri dari media BAP secara aseptis, kemudian dicampurkan dengan reagen katalase pada kaca objek .

(4) Diamati ada tidaknya gumpalan atau bekuan pada reaksi tersebut.

d) Penanaman (inokulasi) pada media MSA

(1) Satu koloni dari media BAP diambil dengan menggunakan ose secara aseptis.

(2) Koloni tersebut ditanam pada media MSA secara aseptis, lalu diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(3) Koloni yang tumbuh pada media pertumbuhkan diamati bentuk, warna, dan tekstur koloni.

e) Uji koagulase

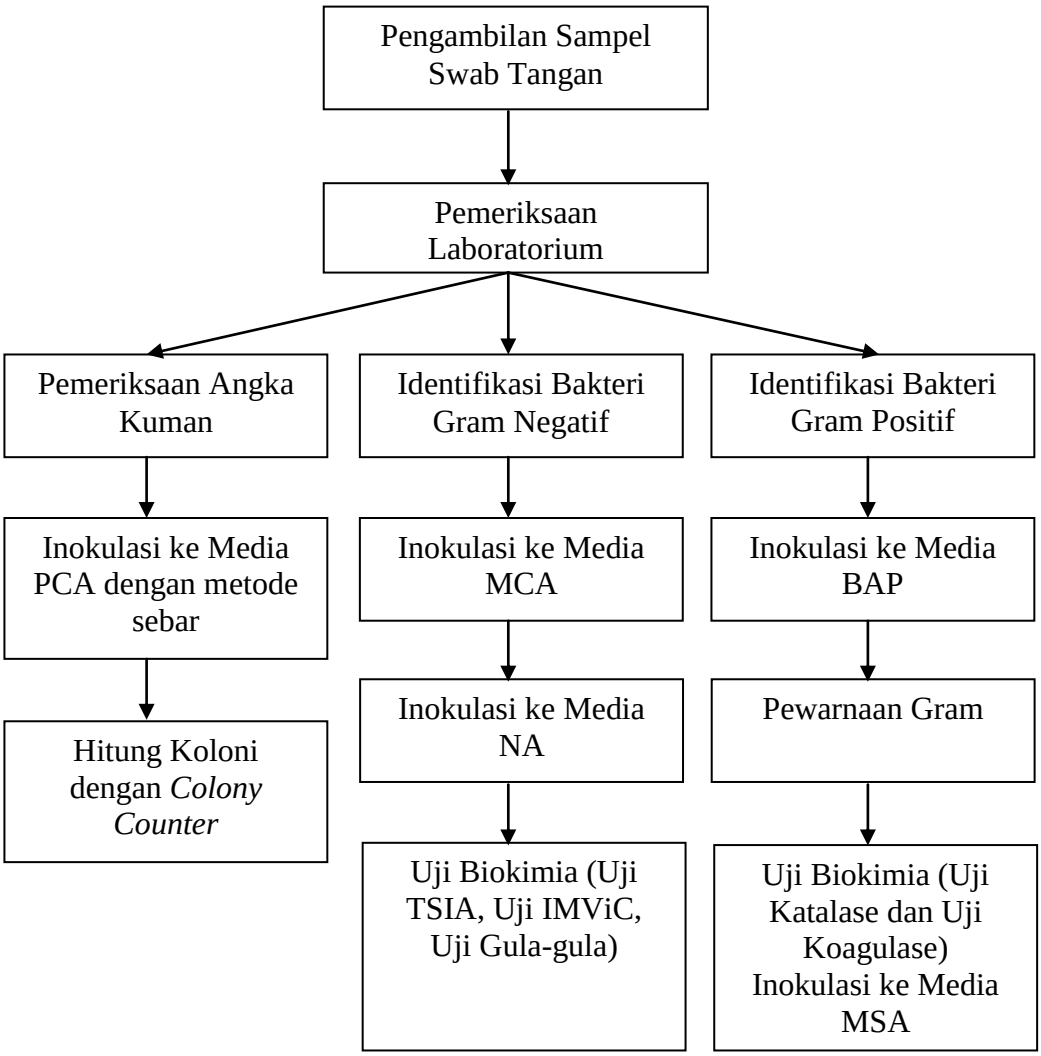
(1) Koloni biakan bakteri yang tumbuh pada media BAP disiapkan.

(2) Dimasukkan 0,5 mL plasma sitrat ke dalam tabung reaksi

(3) Diambil 4 ose dari 1 koloni bakteri dari media BAP ke dalam tabung reaksi

(4) Diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.

(5) Diamati ada tidaknya gumpalan atau bekuan pada tabung reaksi tersebut.



Gambar 2. Skema Kerja

F. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data jumlah angka kuman yang diperoleh dari pemeriksaan hitung cawan dan identifikasi bakteri dikelompokkan, diolah, dan disajikan dalam bentuk tabel kemudian dibahas secara naratif.

2. Analisis data

Analisis data secara statistik tidak dilakukan, data yang didapat dibahas dengan membandingkan kenyataan di lapangan yaitu hasil pemeriksaan jumlah angka kuman pada tangan dengan standar yang ada yaitu berdasarkan WHO tentang angka kuman pada petugas kesehatan, serta mendeskripsikan hasil identifikasi bakteri yang diperoleh.