

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan desain penelitian deskriptif untuk mengetahui adanya perbedaan hasil pewarnaan BTA dari sampel sputum langsung dengan sputum yang ditambahkan NALC-NaOH pada pasien *follow up* tuberkulosis resisten obat di RSUP Surakarta

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Surakarta. Penelitian ini menggunakan data sekunder untuk pewarnaan BTA langsung dan data primer untuk hasil pewarnaan BTA yang ditambahkan NALC-NaOH, diambil bulan April tahun 2025.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah semua sampel pemeriksaan biakan BTA di Laboratorium RSUP Surakarta bulan April 2025.

2. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah sampel pasien follow up TBC resisten obat yang melakukan pemeriksaan biakan BTA di Laboratorium RSUP Surakarta pada bulan April 2025.

3. Teknik *Sampling*

Teknik *sampling* yang dipakai adalah *non random sampling* dengan jenis *quota sampling*. *Quota Sampling* adalah teknik pengambilan sampel yang melibatkan pemilihan sampel berdasarkan proporsi tertentu dari karakteristik populasi yang telah ditetapkan sebelumnya oleh peneliti. (Subhaktiyasa, 2024). Alasan menggunakan teknik tersebut karena jumlah sampel sudah ditentukan dan agar sampel yang diambil dapat mewakili populasi, sehingga peneliti bisa mendapatkan informasi yang cukup.

4. Perhitungan Jumlah sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus slovin yaitu

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2}$$

n = jumlah sampel yang dicari

N = jumlah populasi

e = margin eror yang ditoleransi.

Jumlah perkiraan populasi sebanyak 200, maka jumlah sampel yang didapatkan adalah 133,33 dibulatkan 133 sampel (Zulfikar *et al*, 2024).

5. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi merupakan persyaratan umum yang harus dipenuhi oleh subjek agar dapat diikutsertakan dalam penelitian (Kemenkes, 2018)

a. Pasien *Follow Up* TBC Resisten Obat

- b. Usia diatas 15 tahun
 - c. Dapat mengeluarkan dahak yang cukup untuk pemeriksaan BTA dan kultur
6. Kriteria Ekslusasi

Kriteria eksklusi disebut juga kriteria penolakan, adalah keadaan yang menyebabkan subjek yang memenuhi kriteria inklusi tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian (Kemenkes, 2018).

- a. Pasien Suspek TBC
- b. Usia dibawah 15 tahun
- c. Tidak dapat mengeluarkan dahak yang cukup untuk pemeriksaan sputum dan kultur

D. Variabel penelitian

1. Variabel terikat (*Dependent*) yaitu hasil Pewarnaan BTA sampel sputum langsung dan sputum yang ditambahkan NALC-NaOH
2. Variabel bebas (*Independent*) yaitu pasien *follow up* TBC Resisten Obat (RO)

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara pengukuran	Skala Data
Pewarnaan BTA sampel Sputum Langsung	Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi Basil Tahan Asam (BTA) di dalam sputum pasien secara langsung. Pemeriksaan ini dilakukan dengan metode pewarnaan Ziehl-Neelsen (ZN)	Menggunakan alat Mikroskop	Ordinal Negatif, <i>Scanty</i> , 1+, 2+ dan 3+
Pewarnaan BTA sampel Sputum yang ditambahkan NALC-NaOH	Metode NALC-NaOH adalah metode dekontaminasi kimia yang menggunakan kombinasi N-asetil-L-sistein (NALC) dan natrium hidroksida (NaOH). Metode ini digunakan untuk mendekontaminasi sampel sputum, terutama untuk isolasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada pemeriksaan biakan/kultur.	Menggunakan alat Mikroskop	Ordinal Negatif, <i>Scanty</i> , 1+, 2+ dan 3+
Pasien Follow Up TBC RO	Pasien <i>Follow Up</i> TBC RO adalah pasien tuberkulosis resisten obat (TBC-RO) yang menjalani pengobatan dan pemantauan. Tuberkulosis Resisten Obat (TBC-RO) adalah kondisi dimana bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kebal terhadap obat TBC lini 1 (Rifamfincin dan Isoniazid)	Menggunakan Alat Tes Cepat Molekuler (TCM)	Nominal Sensitif dan Resisten

F. Alat dan Bahan Untuk Pemeriksaan

1. Alat :

- a. Alat-alat keamanan dan keselamatan kerja petugas laboratorium
 - 1) Jas laboratorium
 - 2) Masker
 - 3) Sarung tangan

- 4) Sandal laboratorium
 - 5) *Bio safety*
- b. Alat untuk Pewarnaan *Ziehl Neelsen*
- 1) Lampu Spiritus
 - 2) Korek Api
 - 3) Lidi
 - 4) Pot Sputum
 - 5) *Objek Glass*
 - 6) *Timer*
 - 7) Plastik berisi desinfektan
 - 8) Rak pengecatan
 - 9) *Tissue*
 - 10) Pensil 2B
 - 11) Pinset
 - 12) Tabung konikal 50 cc
 - 13) *Refrigerated centrifuge*
 - 14) Mikropiopet dan tip
 - 15) Mikroskop

2. Bahan :

- a. Sampel sputum
- b. Carbol fuchsin 1%
- c. Asam alkohol 3%
- d. Methylen blue 0,1%

- e. *Oil imersi*
- f. NALC
- g. NaOH
- h. Asam Citrat
- i. Larutan Buffer

G. Prosedur Pemeriksaan

Pemeriksaan laboratorium menurut Isbania, (2021) terdiri dari Pra Analitik, Analitik dan Pasca Analitik :

1. Pra Analitik

- a. Petugas memperkenalkan diri kepada responden (nama lengkap, instansi mana) untuk pasien internal.
- b. Pasien diidentifikasi dengan mengajukan pertanyaan terbuka, minimal 2 identitas responden (contoh identitas: nama lengkap, tanggal lahir responden, dan alamat responden). Sedangkan untuk sampel rujukan, sampel diidentifikasi dan mengecek kesesuaian pengantar dan identitas sampel.
- c. Petugas menjelaskan prosedur yang akan dilakukan kepada responden.
- d. Petugas melakukan desinfeksi tangan .
- e. Petugas memakai alat pelindung diri
- f. Petugas menyiapkan alat yang diperlukan untuk pengambilan spesimen.

2. Analitik

- a. Cara pembuatan preparat dari sputum langsung
 - 1) Kaca obyek dibersihkan dari kotoran dan lemak
 - 2) Petugas menuliskan identitas pada bagian *frosted* dengan menggunakan pensil
 - 3) Petugas membuat apusan dengan cara mengambil sputum yang *purulent* menggunakan lidi/ose jarum dan menggunakan lidi pipih dan membuat ukuran 2x3 cm
 - 4) Sputum diratakan dengan menggunakan lidi kecil dengan gerakan spiral (*coil type*) dan merata
 - 5) Lidi yang telah digunakan dibuang ke dalam tempat dilapisi plastik yang berisi desinfektan
 - 6) Preparat dibiarkan kering di suhu kamar
- b. Cara pembuatan preparat dari sputum yang ditambahkan NALC-NaOH
 1. Sputum dituang ke dalam tabung sentrifus 50 ml. dan menambahkan NALC – NaOH sama banyak.
 - 2) Tabung dikocok hingga homogen sampai tidak lebih dari 30 detik dan mendiamkan selama 15 menit pada suhu kamar.
 - 3) PBS ditambahkan sampai volume 45 ml lalu dibolak-balik tabung beberapa kali.
 - 4) Sampel disentrifus selama 15 menit, 4-12°C, 3000 g.
 - 5) Supernatan dibuan, kemudian tambahkan 1 ml PBS.

- 6) Sedimen diambil menggunakan mikropipet dan dibuat preparat lalu di cat menggunakan cat ZN
- c. Cara pengecatan Ziehl Neelson
 - 1) Sediaan preparat difiksasi
 - 2) Sediaan dijepit dengan menggunakan pinset
 - 3) Sediaan dilewatkan di atas api bunsen biru sebanyak 2-3 kali selama 1-2 detik. Jika dipanaskan terlalu lama dapat menyebabkan sediaan rusak.
 - 4) Sediaan digenangi dengan cat *Ziehl Neelson A (Carbol Fuchsina 1%)* lalu dipanaskan di atas rak pengecatan dengan menggunakan api bunsen. Pemanasan sampai muncul uap dan tidak diperbolehkan sampai mendidih karena akan menimbulkan endapan kristal
 - 5) Sediaan didinginkan sekitar 5-10 menit
 - 6) Sisa carbol fuchsin dibuang, lalu dibilas dengan air mengalir, diusahakan tidak tepat di atas spesimen.
 - 7) Sediaan digenangi dengan ZN B (*Asam Alkohol 3%*) selama 10-20 detik sampai warna merah hilang
 - 8) Sediaan dibilas dengan air mengalir
 - 9) Sediaan digenangi dengan cat ZN C (*Methylen blue 0,1%*) biarkan selama 1 menit
 - 10) Sisa cat ZN C dibuang bilas dengan air mengalir
 - 11) Sediaan dikeringkan sediaan pada rak pengering.

3. Pasca Analitik

Pembacaan dengan mikroskop

- a. Petugas mencari letak fokus lapang pandang pada mikroskop dengan objektif 10 x.
- b. Sediaan yang akan diperiksa disiapkan, lalu ditetes 1 tetes minyak emersi pada sediaan sputum tersebut.
- c. Sediaan dilihat dengan mikroskop menggunakan objektif 100x atau perbesaran 1000x
- d. Petugas mencari BTA dengan ciri-ciri berwarna merah dan bentuk batang.
- e. Sediaan dibaca dengan sekala IUATLD

Negatif : Tidak ditemukan BTA dalam 200 lapang pandang.

+n : Ditemukan 1 – 9 BTA dalam 100 lapang pandang (ditulis jumlah BTanya)

1+ : Ditemukan 10 – 99 BTA dalam 100 lapang pandang.

2+ : Ditemukan 1 – 10 BTA dalam 1 lapang pandang yang diperiksa minimal 50 lapang pandang.

3+ : Ditemukan >10 BTA dalam 1 lapang pandang yang diperiksa minimal 20 lapang pandang.

Sumber : Direktorat Jenderal P2P, 2022

H. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat Yang Digunakan

a. Data Sekunder

Data sekunder diperoleh dari data rekam medis pasien dan atau data pemeriksaan di laboratorium mikrobiologi RSUP Surakarta. Data tersebut adalah hasil pemeriksaan pewarnaan BTA dari sampel sputum langsung pada pasien *follow up* TBC RO pada bulan April 2025.

b. Data Primer

Data hasil pewarnaan BTA sampel sputum yang ditambahkan NALC-NaOH pada pasien *follow up* TBC RO pada bulan April 2025. Proses konsentrasi NALC-NaOH merupakan salah satu tahapan dalam proses pemeriksaan biakan TBC, sehingga sampel dapat diambil dari endapan sisa proses pemeriksaan biakan TBC tersebut.

2. Proses Pengumpulan Data

a. Tahap persiapan

Tahap persiapan yaitu ijin kepada kepala instalasi laboratorium terkait pengambilan data hasil pewarnaan BTA sampel sputum langsung pada pasien follow up TBC Resisten Obat

b. Tahap pengambilan data

Tahap pengambilan data yaitu :

- 1) Mencatat nama dan nomor rekam medis pasien *follow up* TBC RO mulai tanggal 01 April 2025.
 - 2) Mencatat hasil pemeriksaan pewarnaan BTA dari sampel sputum langsung
 - 3) Mengumpulkan endapan sampel biakan BTA metode NALC-NaOH yang sudah dilakukan petugas laboratorium.
 - 4) Melakukan pemeriksaan dan mencatat hasil pewarnaan BTA dari endapan
 - 5) Mencatat hasil biakan BTA yang sudah keluar dan divalidasi hasilnya.
- c. Tahap analisis

Menyajikan data yang telah dikumpulkan ke dalam tabel menggunakan aplikasi *microsost excel* yang selanjutnya akan dianalisis.

I. Teknik Analisis Data

1. Analisis deskriptif

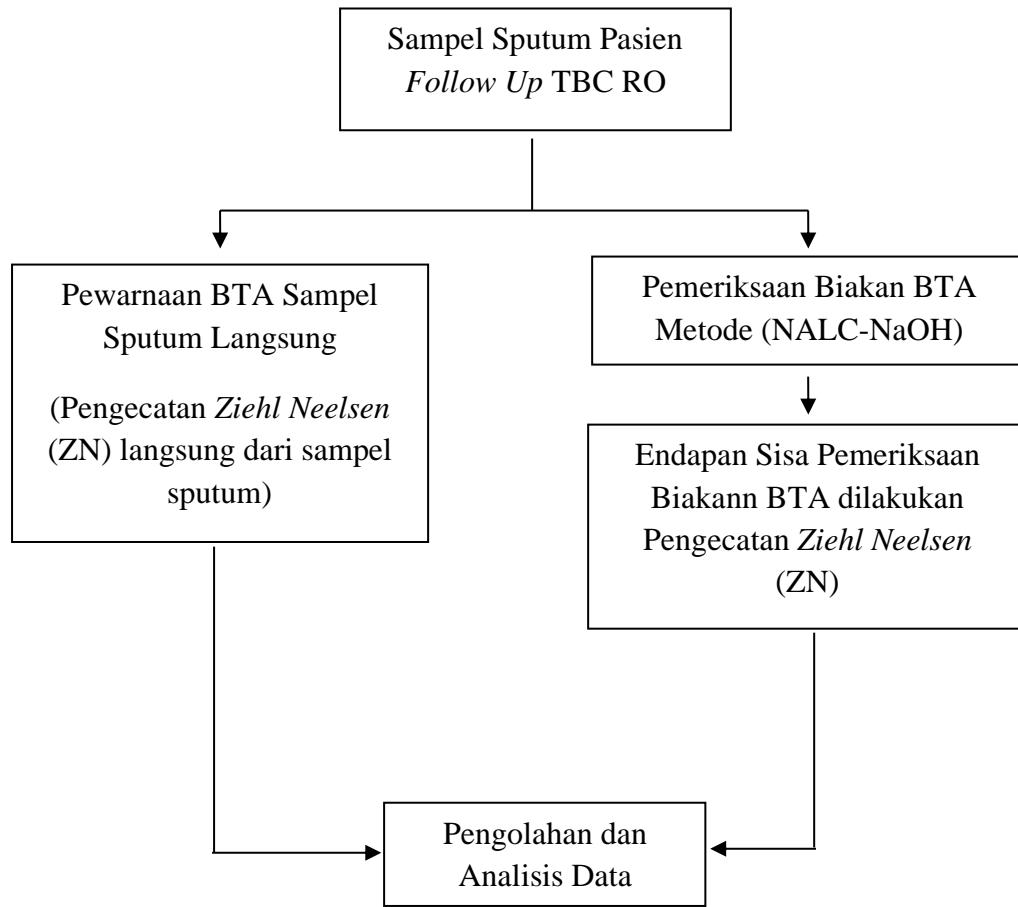
Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel kemudian dianalisa secara deskriptif untuk menjelaskan hasil pewarnaan BTA sampel sputum langsung dan sampel sputum yang ditambahkan NALC-NaOH

2. Analisis statistik

Data hasil pemeriksaan yang terkumpul diolah secara statistik non parametrik dan disajikan dalam bentuk tabel, kemudian dianalisis

menggunakan uji *Mann Whitney* dengan program SPSS. Uji *Mann Whitney* menguji hipotesis komparatif dua sampel *independent* dengan bentuk data ordinal (Zulfikar *et al*, 2024).

J. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian