

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah analitik dengan desain penelitian *cross sectional*. Variabel independen penelitian ini adalah hasil pemeriksaan kultur bakteri pada pasien ISPA. Variabel dependen adalah neutrofil granula toksik, jumlah neutrofil absolut, dan jumlah leukosit pada pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro untuk pemeriksaan hitung jumlah leukosit serta Laboratorium Hematologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk pemeriksaan hitung jumlah neutrofil absolut dan neutrofil granula toksik.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2024. Pengambilan sampel dilakukan pada 29 Januari – 22 Februari 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah 40 orang pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro.

2. Sampel

Sampel penelitian ini diambil dari populasi yaitu subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak tergolong kriteria eksklusi, pada penelitian ini diperoleh 33 sampel. Kriteria yang digunakan meliputi :

a. Kriteria Inklusi

Pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro dengan hasil identifikasi spesies bakteri penyebab ISPA (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, dan *Staphylococcus simulans*).

b. Kriteria Eksklusi

Pasien yang memiliki komplikasi penyakit lain yang mempengaruhi hasil pemeriksaan hematologi rutin, seperti leukemia, penyakit tiroid, penyakit sistemik parah seperti lupus eritematosus, pasien kemoterapi, atau sindrom cushing.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel Bebas :					
	Hasil Kultur Bakteri Pasien ISPA	Pasien yang didiagnosa menderita ISPA di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro berdasarkan hasil pemeriksaan kultur bakteri dengan diketahui spesies bakteri yang menginfeksi.	Rekam Medik	Observasi	Spesies Bakteri Penyebab ISPA - <i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i> - <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumonia</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Staphylococcus sciuri</i> - <i>Staphylococcus simulans</i>	Nominal
2.	Variabel Terikat :					
	Neutrofil Granula toksik	Neutrofil dengan granula abnormal yang tampak mencolok dan kasar, pemeriksaan menggunakan sediaan apus darah (SAD) yang diwarnai dengan cat Wright-Giemsa pada pasien ISPA yang	Mikroskop	Sediaan Apus Darah (SAD) dengan pengecatan Wright-Giemsa	(+) terdapat neutrofil granula toksik (-) tidak terdapat neutrofil granula toksik	Ordinal

	menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro				
Jumlah Neutrofil Absolut	Jumlah sel neutrofil absolut pada pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro yang didapat dari hasil hitung jenis leukosit secara manual dengan sediaan apus darah dan dilakukan perhitungan dengan rumus	Rekam Medik	Observasi	- Neutrofilia - Neutrofil normal - Neutropenia	Ordinal
Jumlah Leukosit	Jumlah sel leukosit pada pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro dari hasil pemeriksaan hematologi rutin	Rekam Medik	Observasi	- Leukositosis - Leukosit normal - Leukopenia	Ordinal

E. Pengumpulan Data

Data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer dan data sekunder. Data primer didapatkan melalui pemeriksaan hitung jumlah neutrofil absolut dan neutrofil granula toksik pada sediaan apus darah (SAD) dengan menggunakan darah pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro. Sedangkan data sekunder diperoleh dengan mencatat hasil pemeriksaan hematologi rutin pasien dari rekam medik dan data hasil pemeriksaan kultur bakteri di Laboratorium RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro.

1. Persiapan Penelitian

- a. Dilakukan penelusuran pustaka untuk memperoleh perspektif ilmiah dari penelitian.
- b. Dilakukan pengajuan permohonan surat izin penelitian dan pengambilan data tertujukan Direktur Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang yang selanjutnya akan diteruskan ke RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro.

- c. Setelah mendapatkan izin dari rumah sakit, selanjutnya pengambilan data primer diperoleh dari sampel darah pasien ISPA yang menjalani pemeriksaan kultur bakteri setelah pemeriksaan hematologi rutin untuk dibuat sediaan darah apus (SAD). Selanjutnya melakukan pemeriksaan hitung jumlah neutrofil absolut dan neutrofil granula toksik secara mikroskopis.
- d. Peneliti memeriksa status pasien dan mengumpulkan data sekunder di bagian rekam medik RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro.

2. Prosedur Penelitian

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi tabung EDTA, pipet tetes, object glass, dan mikroskop. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah darah vena, cat Wright-Giemsa, methanol absolut, minyak imersi, dan kapas alkohol 70%.

b. Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan dilakukan dengan melakukan pengamatan sediaan apus darah (SAD) secara mikroskopis dengan pewarnaan Wright-Giemsa.

c. Persiapan Sampel Darah

- 1) Dilakukan pengambilan darah vena sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi antikoagulan K₂EDTA (tabung tutup ungu)
- 2) Sampel darah dihomogenkan
- 3) Pemeriksaan hematologi rutin dilakukan dengan segera menggunakan alat *Hematology Analyzer*

d. Prosedur Pemeriksaan Neutrofil Granula Toksik

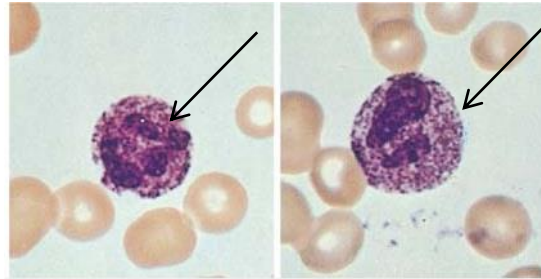
Prinsip : Sampel darah vena + EDTA ditetaskan pada kaca objek lalu dibuat apusan membentuk seperti lidah, selanjutnya sediaan diwarnai dengan pewarnaan Wright-Giemsa dan dikeringkan kemudian dibaca pada mikroskop.

1) Pembuatan Sediaan Apus Darah

- a) Persiapan alat dan bahan
- b) Dipilih kaca objek yang bersih, kering, bebas lemak, dan bebas debu untuk dibuat preparat
- c) Dipilih kaca objek yang memiliki tepian rata sebagai kaca penghapus

- d) Ditetaskan satu tetes kecil darah pada ujung kaca objek sekitar $\geq 2-3$ mm dari tepi
 - e) Kaca penghapus lain diposisikan membentuk sudut $30^\circ - 45^\circ$ di depan tetes darah sebagai objek
 - f) Kaca penghapus ditarik ke belakang sampai menyentuh tetes darah, selanjutnya darah akan menyebar hingga tepi kaca objek
 - g) Kaca penghapus didorong dengan yakin sehingga terbentuk apusan darah berbentuk menyerupai lidah
 - h) Apusan darah dibiarkan pada udara terbuka hingga mengering
 - i) Identitas pasien ditulis pada bagian buram kaca objek dengan pensil (Gandasoebrata, 2009).
- 2) Pewarnaan Wright-Giemsa
 - a) Sediaan difiksasi dengan methanol absolut 5 menit.
 - b) Sediaan digenangi dengan larutan Wright selama 1 menit.
 - c) Sediaan digenangi dengan larutan Giemsa yang sudah diencerkan 20x lalu didiamkan 15 menit, dibilas dengan air mengalir
 - d) Dikeringkan preparat dan diperiksa pada mikroskop perbesaran 40x atau 100x.
 - 3) Pengamatan Neutrofil Granula Toksik
 - a) Sediaan apus darah diletakkan di bawah mikroskop pada perbesaran lensa okuler 10x dan objektif 10x untuk melakukan pengamatan sebaran sel darah yang merata
 - b) Revolver lensa objektif diputar menjadi perbesaran 40x untuk melakukan pengamatan menilai leukosit pada sediaan apus darah.
 - c) Ditetaskan minyak imersi pada sediaan lalu revolver lensa objektif diputar pada perbesaran 100x dan dilakukan pengamatan bagian tipis pada sediaan untuk memperjelas morfologi sel darah.
 - d) Pengamatan bentuk dan jenis leukosit
 - e) Perhitungan jumlah neutrofil absolut yang ditemukan pada sediaan sesuai jenis pada tabel perhitungan (dihitung per 100 leukosit)

- f) Dilakukan pengamatan dan pencatatan neutrofil granula toksik yang ditemukan dengan ciri terlihat granula tampak kasar dan sitoplasma sel berwarna mencolok ungu/biru kehitaman.



Sumber : Greer, 2019

Gambar 3.1 Neutrofil Granula Toksik.

- g) Perhitungan jumlah neutrofil absolut atau *absolute neutrophil count (ANC)* dilakukan secara manual dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Neutrofil Absolut (ANC)} &= \frac{(\text{Neutrofil stab} + \text{Neutrofil segmen})}{100} \times \text{Jumlah Leukosit (sel}/\mu\text{L)} \\ &= \dots \text{ sel}/\mu\text{L} \end{aligned}$$

Sumber : Turgeon, 2019

- h) Penemuan neutrofil granula toksik menunjukkan bahwa terdapat morfologi leukosit yang tidak normal yakni sebagai benda inklusi dalam leukosit. Neutrofil granula toksik dihitung dalam 100 leukosit (Gandasoebrata, 2009).
- e. Pemeriksaan Hematologi Rutin

Metode : *Flow cytometry* dengan alat Sysmex XN550

Prinsip : Jumlah leukosit dan neutrofil secara sistematis dihitung pada setiap lapang pandang secara sistematis dengan alat *Hematology Analyzer* atau dicatat manual hingga ditemukan 100 leukosit (Kiswari, 2014).

Prosedur kerja :

- 1) UPS dihidupkan
- 2) Dinyalakan monitor pada alat dengan menekan tombol power ON
- 3) Dimasukkan password pada monitor
- 4) Alat akan background check dengan sendirinya untuk persiapan dilakukan quality control

- 5) Dilakukan quality control dengan menggunakan darah control. Dipilih menu manual, lalu masuk pada menu QC dan dimasukkan kontrol sesuai level 1, level 2, dan level 3
- 6) Untuk pemeriksaan sampel dipilih menu work list
- 7) Dipilih menu regist pada monitor, lalu dimasukkan data pasien dengan menggunakan scan barcode pada tabung, dan klik OK
- 8) Dimasukkan tabung darah ke dalam alat dengan menekan tombol yang ada di alat
- 9) Alat akan melakukan pemeriksaan otomatis dan hasil akan tampak pada layar dalam waktu kurang lebih 1 menit. Hasil tersimpan di dalam memori alat dan tertransfer ke LIS laboratorium

Tabel 3.2 Nilai Normal Hitung Leukosit

Nilai Hitung Leukosit			
Dewasa		Anak	
Jenis Leukosit	%	$\mu\text{l (mm}^3\text{)}$	Sama dengan dewasa, kecuali
Basofil	0,4-1,0	40-100	
Eosinofil	1-3	100-300	
Neutrofil (total)	50-70	2500-7000	Bayi baru lahir = 61% Usia 1 Tahun = 32%
Stab	0-5	0-500	
Segmen	50-65	2500-6500	
Limfosit	25-35	1700-3500	Bayi baru lahir = 34% Usia 1 tahun = 60% Usia 6 tahun = 42% Usia 12 tahun = 38%
Monosit	4-6	20-600	Usia 1-12 tahun = 4% - 9%

Sumber : Aliviameita, 2019

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dilakukan berdasarkan hasil penelitian dengan langkah-langkah berikut :

- a. *Coding* merupakan tahapan yang dilakukan untuk memberikan kode pada saat memasukkan data ke dalam komputer
- b. *Entry Data* adalah sebuah tahapan saat peneliti memasukkan data-data ke aplikasi pada komputer yaitu program *SPSS for windows*

c. Processing

Tahap di mana peneliti melakukan proses pengetikan data dari *checklist* ke program komputer agar dapat dianalisis

d. *Cleaning* adalah tahapan yang dilakukan untuk mengecek kembali data yang telah dimasukkan, guna menghindari kesalahan pada saat memasukkan data.

2. Analisis Data

Data hasil penelitian akan dianalisis dengan menggunakan Analisis Univariat dan Bivariat dengan uji *chi-square* untuk mengetahui hubungan neutrofil granula toksik, jumlah neutrofil absolut, dan jumlah leukosit dengan bakteri pada pasien ISPA di RSUD Jend. Ahmad Yani Kota Metro.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian dilakukan dengan menggunakan spesimen darah sebagai subjek dan sampel penelitian. Maka diperlukan kaji etik terhadap penelitian yang dilaksanakan dengan cara memberikan naskah proposal ke Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk penilaian kelayakan. Peneliti mendapatkan surat keterangan laik etik dengan nomor surat No.287/KEPK-TJK/III/2024 tanggal 06 Maret 2024. Penelitian dilakukan berdasarkan standar operasional prosedur yang telah ada dan seluruh identitas subjek penelitian bersifat rahasia. Keseluruhan biaya yang diperlukan untuk penelitian ini ditanggung oleh peneliti.