

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

##### **3.1.1 Ruang lingkup keilmuan**

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah bidang Ilmu Mikrobiologi Klinik

##### **3.1.2 Ruang lingkup tempat**

Penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi FK Undip / Rumah Sakit Nasional Diponegoro dan laboratorium Mikrobiologi Klinik FK Undip/ Rumah Sakit Nasional Diponegoro.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Mei sampai dengan Juli 2017 di Rumah Sakit Nasional Diponegoro dan laboratorium Mikrobiologi Klinik FK Undip.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian quasi *experimental* dengan desain penelitian *pretest posttest randomized group*

### 3.4 Subjek penelitian

#### 3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini meliputi semua *alcohol-based handrub* formula WHO A dan komersial

#### 1.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ABHR formula WHO A, dan komersial yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, yang meliputi :

a) Kriteria inklusi :

- ABHR formula WHO A 100 ml
- Formula A memiliki kadar ethanol  $80\% \pm 2\%$
- *hand rub* komersial “Aseptic Gel” dengan ethanol 70%

b) Kriteria eksklusi :

- Botol rusak
- Isi kemasan terlalu keruh

#### 3.4.3 Penghitungan besar sampel

Dihitung menggunakan rumus Frederer, dengan langkah:

$$(t-1)(r-1) > 15$$

dimana:

t = banyaknya kelompok perlakuan (2)

$r$  = jumlah replikasi

sehingga

$$(2-1)(r-1) > 15$$

$$r = 16$$

Dibutuhkan 16 sampel formula WHO A dan 16 sampel *hand rub* komersial yang selanjutnya akan ditempatkan di laboratorium mikrobiologi FK Undip / RSND

### 1.4.3 Cara pengambilan sampel

Sampel diambil secara *consecutive sampling* sampai sampel penelitian memenuhi target.

## 3.5 Variabel Penelitian

### 3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

- ABHR yang digunakan
- lama penyimpanan

### 3.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efektivitas *handrub* yang dinyatakan dalam *colony forming unit/ml*

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 6 Definisi operasional**

Jenis Variabel	Variabel	Definisi Operasional	Skala	Nilai
Bebas	ABHR	Formula WHO A terdiri dari Ethanol 80% (v/v), Glycerol 1.45% (v/v), Hydrogen peroxide 0.125% (v/v). ABHR komersial “Aseptic Gel” dengan alkohol 70%, Deionize water Carbomer, TEA, PEG 40	Nominal	1. WHO A 2. komersial
Bebas	Lama penyimpanan	Sampel disimpan dalam waktu 4 minggu	Nominal	1. 0 hari 2. 28 hari
Tergantung	Efektivitas <i>handrub</i>	Dinilai menurut prosedur prEN12054 dan dinyatakan dalam cfu (colony forming unit)	Numerik	1. CFU

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data pada penelitian ini meliputi:

#### 3.7.1 Alat

1. Membuat *alcohol-based hand rub* (ABHR) formula WHO

- a. Botol plastik ukuran 10 liter
- b. Pengaduk kayu
- c. Silinder ukur
- d. Botol plastik ukuran 100 ml
- e. Alkoholmeter

2. Prosedur prEN 12054

- a. Cawan petri
- b. *Waterbath*
- c. *Stopwatch*
- d. *Vortex*
- e. *Test tubes*
- f. Mikropipet
- g. Cawan petri

#### 3.7.2 Bahan

1. WHO formula A

- a. Ethanol 96% 4167ml
- b. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 208 ml
- c. Gliserol 98% 72ml
- d. Air 553ml

2. ABHR komersial “Aseptic Gel” dengan kadar alkohol 70%

3. 0,5 McFarland suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

4. Diluent

a. Tripton, enzim pencernaan pankreas kasein, USP 1g

b. NaCL, EP 8,5g

c. Air 1000ml

5. Medium netralisasi

a. Polisorbat 80 (30ml)

b. Lesitin (30g/L)

c. Sodium tiosulfat (5g/L)

### **3.7.3 Jenis data**

Penulis menggunakan jenis data primer sebagai bahan acuan dalam melakukan penelitian yang merupakan hasil pemeriksaan *bactericidal activity* dari ABHR formula WHO A dan komersial sebelum dan sesudah disimpan di laboratorium mikrobiologi FK Undip / RSND selama 4 minggu.

### **3.7.4 Cara kerja**

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari berbagai tahap, yaitu pembuatan ABHR formula A, validasi suspensi bakteri, validasi *non toxicity neutralizer*, validasi efektivitas *neutralizer*, penentuan efektivitas *handrub* formula WHO dan komersial sebelum penyimpanan, penyimpanan *handrub* di laboratorium mikrobiologi FK Undip / RSND, dan yang terakhir penentuan efektivitas *handrub* formula WHO dan komersial setelah penyimpanan.

#### **3.7.4.1 Tahap pembuatan ABHR formula A**

1. Memasukkan etanol ke dalam tangki 10 L

2. Memasukkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ke dalam tangki dengan menggunakan silinder pengukur
3. Memasukkan gliserol ke dalam tangki dengan menggunakan silinder ukur.
4. Karena sifat gliserol yang lengket, gunakan air mendidih yang telah didinginkan untuk mengosongkan silinder ukur.
5. Tambahkan air sampai volumenya mencapai 5L
6. Tutup untuk mencegah penguapan.
7. Kocok sampai merata
8. Tuangkan ke dalam kemasan masing-masing 100ml.
9. Tunggu sampai 72 jam supaya semua spora mati.

#### **3.7.4.2 Tahap validasi suspensi bakteri**

1. Siapkan suspensi bakteri 0,5 McFarland *Staphylococcus aureus* Lakukan serial dilusi 10<sup>-6</sup> menggunakan diluents yang telah tersedia (Trypton, enzim pencernaan pancreas kasein, USP 1g NaCl, EP 8,5g, air 1000ml) sampai diharapkan didapatkan 1,5 x 10<sup>2</sup> cfu/ml.
2. Homogenisasi suspensi menggunakan *vortex mixer*.
3. Ambil sampel masing-masing sebanyak 200 µl untuk diinokulasikan secara duplo menggunakan *pour plate* atau *spread plate* pada medium TSA,
4. Inkubasi plate dalam 36°C selama 42 sampai 48 jam. Hitung cfu dan masukan nilainya ke dalam (N)

#### 3.7.4.3 Tahap validasi *non toxicity neutralizer*

1. Letakkan 9 ml medium netralisasi di dalam tube sterile.
2. Lakukan dilusi suspensi bakteri 0,5 McFarland sampai didapatkan  $1,5 \times 10^3$  cfu/ml (pengenceran  $10^{-5}$ )
3. Tambahkan 1 ml hasil dilusi tersebut kepada 9 ml media netralisasi
4. Vortex selama beberapa detik
5. Taruh di waterbath 20°C selama 1 menit
6. Segera ambil 200  $\mu$ l sampel dan inokulasikan ke dalam medium TSA secara duplo menggunakan spread plate
7. Inkubasi dalam 360°C selama 42-48 jam
8. Hitung jumlah *colony forming unit* dan nyatakan dalam nilai **N'**

#### 3.7.4.4 Tahap validasi efektivitas neutralizer

1. Letakkan 1 ml medium diluent ke dalam 9 ml produk
2. Letakkan di dalam waterbath 20°C selama 5 menit
3. Tambahkan 1 ml hasil campuran tersebut kepada 8 ml media netralisasi
4. Letakkan di dalam waterbath 20°C selama 5 menit
5. Ambil 1 ml hasil dilusi bakteri  $10^3$  dan masukkan ke dalam campuran.
6. Vortex selama beberapa detik
7. Letakkan di dalam waterbath 20°C selama 5 menit
8. Vortex selama beberapa detik
9. Segera ambil 200  $\mu$ l sampel dan inokulasikan ke dalam medium TSA secara duplo menggunakan spread plate
10. Inkubasi dalam 360°C selama 42-48 jam

11. Hitung jumlah *colony forming unit* dan nyatakan dalam nilai **N'**

#### **3.7.4.5 Tahap penyimpanan**

1. Persiapkan masing-masing 5 botol ABHR formula WHO A dan komersial dalam kardus terbuka
2. Letakan di dalam ruang laboratorium mikrobiologi FK Undip / RSND
3. Tulis peringatan untuk penelitian
4. Gunakan ABHR setiap hari
5. Ukur suhu dan tekanan tiap hari
6. Ukur kadar alkohol dengan alkoholmeter setiap 5 hari sekali

#### **3.7.4.6 Tahap pengujian *bactericidal activity handrub***

1. Siapkan suspensi bakteri, media netralisasi, dan *handrub* ke dalam waterbath 20°C untuk ekuilibrasi suhu
2. Masukkan 9ml *handrub* ke dalam kontainer berkapasitas 25 ml
3. Masukkan 1ml suspensi bakteri 0,5 McFarland
4. Vortex selama 5 detik
5. Hitung waktu kontak di waterbath selama 45 detik
6. Vortex selama 10 detik sehingga waktu kontak total adalah 1 menit
7. Segera ambil 1 ml larutan tersebut dan masukan ke container lain
8. Campur 8ml medium netralisasi ke dalam larutan tersebut
9. Masukkan 1ml air
10. Vortex 10 ml campuran tersebut selama 5 detik
11. Tunggu selama 55 detik dalam waterbath sehingga waktu kontak total adalah 1 menit

12. Ambil 200  $\mu$ l lalu inokulasikan ke dalam TSA sebanyak 2 cawan.
13. Inkubasi dalam suhu 36 $^{\circ}$ C selama 42 sampai 48 jam.
14. Hitung jumlah cfu/ml untuk mendapatkan nilai **n'**

Memenuhi syarat prEN12054 jika :

- Nilai **N**, dan **N'** antara 100-300 cfu
- **N'** sama atau lebih besar dari 0,5 x **N**
- **n'** sama atau lebih besar dari 0,5 x **N'**
- Pengurangan bakteri mencapai log 5. Hasil akhir antara  $1 \times 10^2$  -  $3 \times 10^2$  cfu/ml

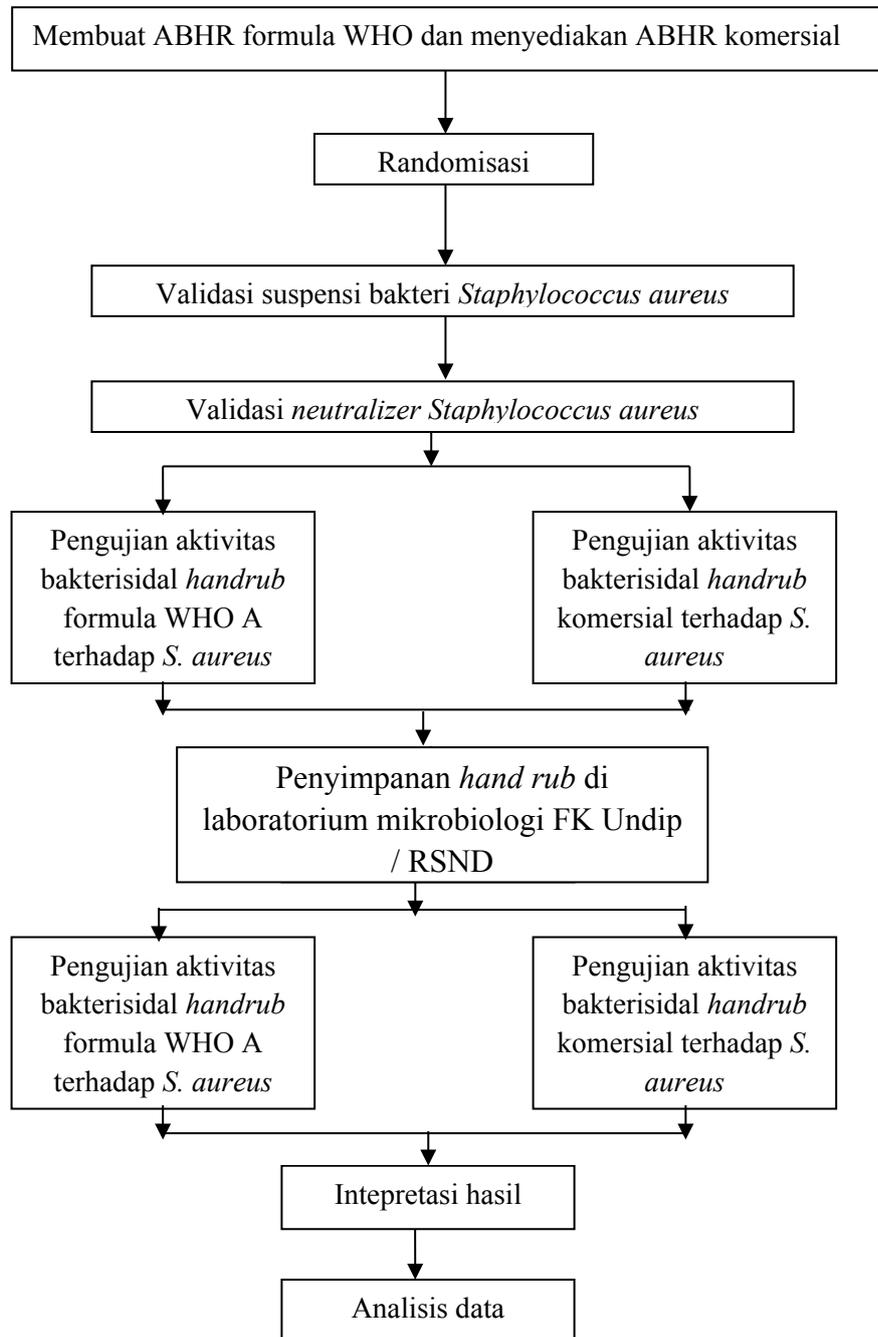
Dimana

**N** : nilai rata-rata dari validasi bakteri suspensi dalam cfu

**N'** : nilai rata-rata dari validasi *neutralizer non toxicity*

**n'** : nilai rata-rata dari validasi efektivitas neutralizer

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

### 3.9 Pengelolaan dan Analisis Data

1. Pengolahan data dilakukan dengan berbagai tahap yaitu :
  - a) *Coding* yaitu data diberi kode yang sesuai dengan kriteria masing-masing variabel.
  - b) *Entry* yaitu memasukkan data kedalam program komputer
  - c) *Editing* atau koreksi meliputi kelengkapan jawaban dan tulisan yang kurang jelas
  - d) *Cleaning*
2. Analisis data menggunakan uji korelasi dan asosiasi. Uji asosiasi dapat menggunakan uji T tidak berpasangan atau Mann Whitney untuk hipotesis yang pertama membandingkan ABHR formula A dan komersial. Uji Anova atau Kruskal Wallis dapat digunakan untuk hipotesis tempat penyimpanan. Dilanjutkan dengan uji post hoc tukey bila perlu, Uji T berpasangan atau Wilcoxon digunakan untuk membandingkan efektivitas sebelum dan sesudah disimpan. Uji korelasi menggunakan Pearson atau Spearman.
3. Interpretasi, yaitu mengartikan hasil analisis yang diperoleh.

### **3.10 Keterbatasan Penelitian**

Keterbatasan dari penelitian ini adalah adanya kemungkinan variabel pengganggu seperti kontaminasi.

### **3.11 Etika Penelitian**

Ijin penelitian dilakukan dengan meminta *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Nasional Diponegoro dan proposal Karya Tulis Ilmiah diajukan. Penelitian dilakukan setelah *ethical clearance* terbit.

