

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Metode penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan melakukan manipulasi yang bertujuan untuk mengetahui akibat terhadap perilaku suatu objek penelitian yang diamati (Latipun, 2002). Pada penelitian ini peneliti menggunakan penelitian eksperimen untuk mengetahui daya bunuh kuman terhadap beberapa produk antiseptik berbahan aktif alcohol dan triclosan pada bakteri *Staphylococcus Aureus* menggunakan metode Percentage kill.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah seluruh sediaan hand sanitizer yang diperjualbelikan dan diperoleh dari berbagai pedagang di Pasar Tanjung Kabupaten Jember.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan sebanyak 3 macam hand sanitizer dengan merk yang berbeda yang dijual di Pasar Tanjung Kabupaten Jember yang banyak digunakan berdasarkan bahan aktif yang tertulis yaitu alcohol 73% dan triclosan 0,5%, alcohol 60%, dan tanpa bahan aktif.

3.3 Waktu dan tempat penelitian

3.3.1 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan 23 maret - 18April 2021

3.3.2 Tempat penelitian

sampel penelitian diperoleh dari pasar tanjung kabupaten Jember, penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia-Farmasi Universitas Machung yang berada di Jl. Villa Puncak Tidar N-01 Kota Malang

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu neraca analitik(ABS 220-4), autoclave (SS XFS-280A), oven (Binder), incubator (memmert), laminar air flow

(mascotte), colony counter (Funke Gerber), vortex (Mixer Ika), mikro pipet (adjustable), spatula, Erlenmeyer (pyrex 200ml), Erlenmeyer (pyrex 250ml), gelas ukur 10ml(Iwaki), gelas ukur (pyrex 100:1ml), cawan petri (anumbra), ose bulat, tabung reaksi (herma), Bunsen, beaker gl(iwaki), pipet ukur 5ml (iwaki), pipet ukur 0,5ml(iwaki), pipet pump, benang(knitting), kapas (one med), aluminium foil (Bestfresh), blue tip (GP), label, alat tulis.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu hand sanitizer yang akan diuji, aquadest(H₂O)(Aquastill), media nutrient agar (NA)(Oxoid), media Muller Hinton Agar (MHA) (Merck), NaCl 0,9%(Merck), alcohol 70%(labware) dan biakan staphylococcus aureus.

3.4 Variabel penelitian

3.4.1 Variabel Bebas (Independen Variabel)

Variable bebas merupakan variable yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya viable dependen (terikat) (Sugiono, 2017)

Dalam penelitian ini yang menjadi variable bebas adalah tiga merk dagang hand sanitizer yang beredar di pasar tanjung kabupaten jember, yaitu hand sanitizer A, B, dan C, bahan aktif Alkohol dan triclosan, suhu, dan lama penyimpanan

3.4.2 Variabel Terikat (Dependen Variabel)

Variabel dependen merupakan variable konsekuen, kriteria, dan output. Variable dependen juga disebut sebagai variable terikat. Adanya variable terikat dapat menjadi akibat dan pengaruh bagi variable tersebut (Sugiono, 2013) Variable terikat dalam penelitian ini adalah daya bunuh kuman.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional penelitian menurut sugiyono (2015) adalah suatu atribut atau sifat nilai dari objek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti atau dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Dari penelitian yang dilakukan dapat dirumuskan definisi operasionalnya sebagai berikut:

Variable	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Hand sanitizer	Merk dagang hand sanitizer yang beredar di pasar tanjung kabupaten jember. Bahan yang mengandung zat aktif antimikroba alcohol, triclosan.	Colony counter	-Terdapat berbagai variasi lama penyimpanan 5 hari dan 15 hari. -Terdapat berbagai variasi suhu 10 ⁰ C dan suhu 40 ⁰ C -Masing-masing dibuat tiga kali pengulangan dan 1 kontrol	Rasio
Menghasilkan daya bunuh kuman terhadap Bakteri Staphylococcus aureus	Uji percentage kill	Colony counter	Nilai daya bunuh kuman dalam satuan (%)	Rasio

3.6 Metode Penelitian (prosedur penelitian)

3.6.1 Uji Aktivitas Antimikroba

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilisasi terlebih dahulu. Tabung reaksi, gelas ukur dan Erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas. Cawan petri pipet volume dibungkus dengan alumium

foil, disterilkan dengan menggunakan oven, yaitu dengan cara memasukkan alat-alat tersebut kedalam oven dan dipanaskan dengan suhu 180⁰C selama 1- 2 jam (Kharisma, 2012). Jarum ose disterilkan dengan cara flambir pada nyala bunsen. Laminar Air Flow disterilisasi dengan lampu UV yang dinyalakan selama lebih kurang 2 jam dan disemprotkan dengan alkohol 70% sebelum digunakan. Sterilisasi Laminar ini dilakukan sebelum dan sesudah bekerja didalamnya (Pertiwi, 2010)

seluruh media disterilkan dengan autoklaf pada temperature 121⁰C selama 15 menit (pertiwi,2010).

3.6.2 Pembuatan media dan sterilisasi

Penelitian ini menggunakan media Nutrien Agar untuk meremajakan biakan bakteri staphylococcus aureus dan Muller Hinton Agar untuk metode percentage kill. Peremajaan bakteri bertujuan agar bakteri memulai metabolisme Kembali setelah penyiapan (Nanik.2014).

a. Pembuatan Media Nutrien Agar Miring

- Menimbang media NA 1,15 gram dilarutkan kedalam 50ml Aquades dalam Erlenmeyer.
- Kemudian dipanaskan hingga larut dengan menggunakan hotplate.
- Dipipet 10ml dimasukkan kedalam tabung reaksi, tutup mulut tabung reaksi dengan kapas.
- Disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
- Tabung media agar diletakkan pada kemiringan 45⁰C biarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat. Perlu diperhatikan bahwa media agar tidak menyentuh tutup tabung. Media NA dibiarkan menjadi dingin dan keras. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri.

B. Peremajaan Kultur Murni Bakteri Uji

Mengambil satu koloni biakan murni bakteri staphylococcus aureus diambil dengan menggunakan ose steril, kemudian di tanamkan dalam media Nutrien Agar (NA) miring, kemudian di inkubasi dalam incubator pada suhu 37⁰C selama 1x 24 Jam.

C. Pembuatan Media Muller Hinton Agar

Media MHA digunakan sebagai media tanam bakteri staphylococcus aureus pada metode percentage kill. Berikut cara pembuatan media

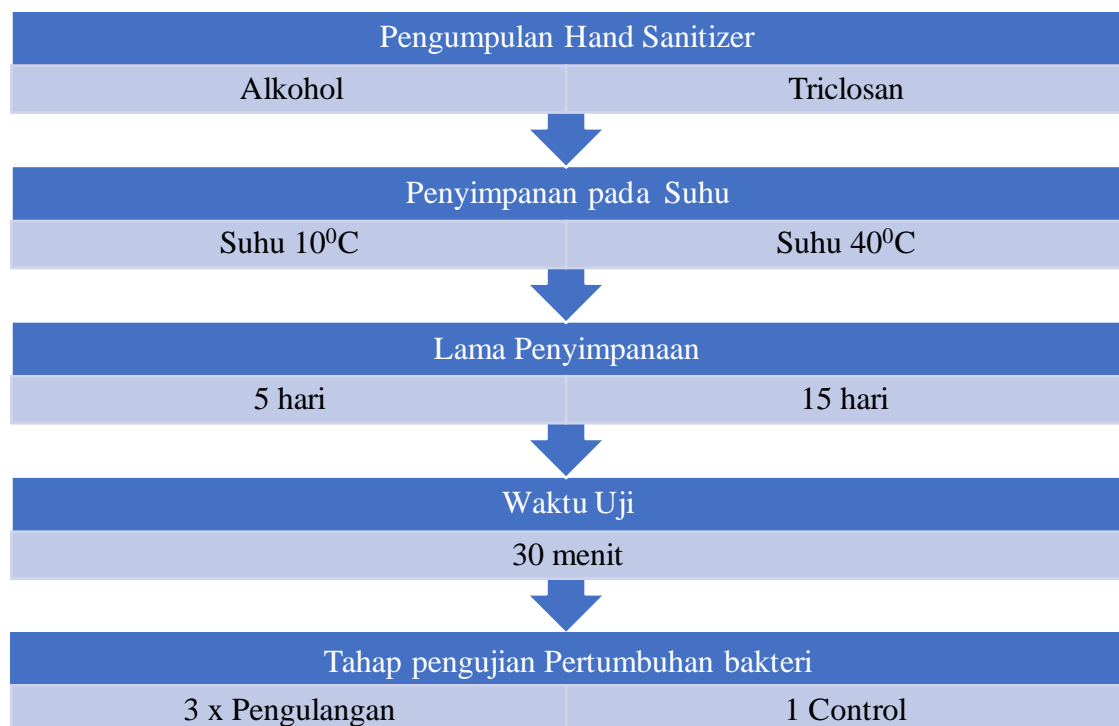
- menimbang padatan MHA 5,6 gram dilarutkan ke dalam 250ml aquades dimasukkan kedalam Erlenmeyer.
- kemudian dipanaskan hingga larut larut dengan menggunakan hotplate.
- ditutup mulut Erlenmeyer menggunakan kapas
- disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

D. Pembuatan NaCl 0,9%

Menimbang padatan NaCl 0,9 gram dilarutkan dalam 100ml aquades di homogenkan hingga larut.

- Di pipet 10ml dimasukkan kedalam tabung reaksi di tutup dengan kapas
- Di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
-

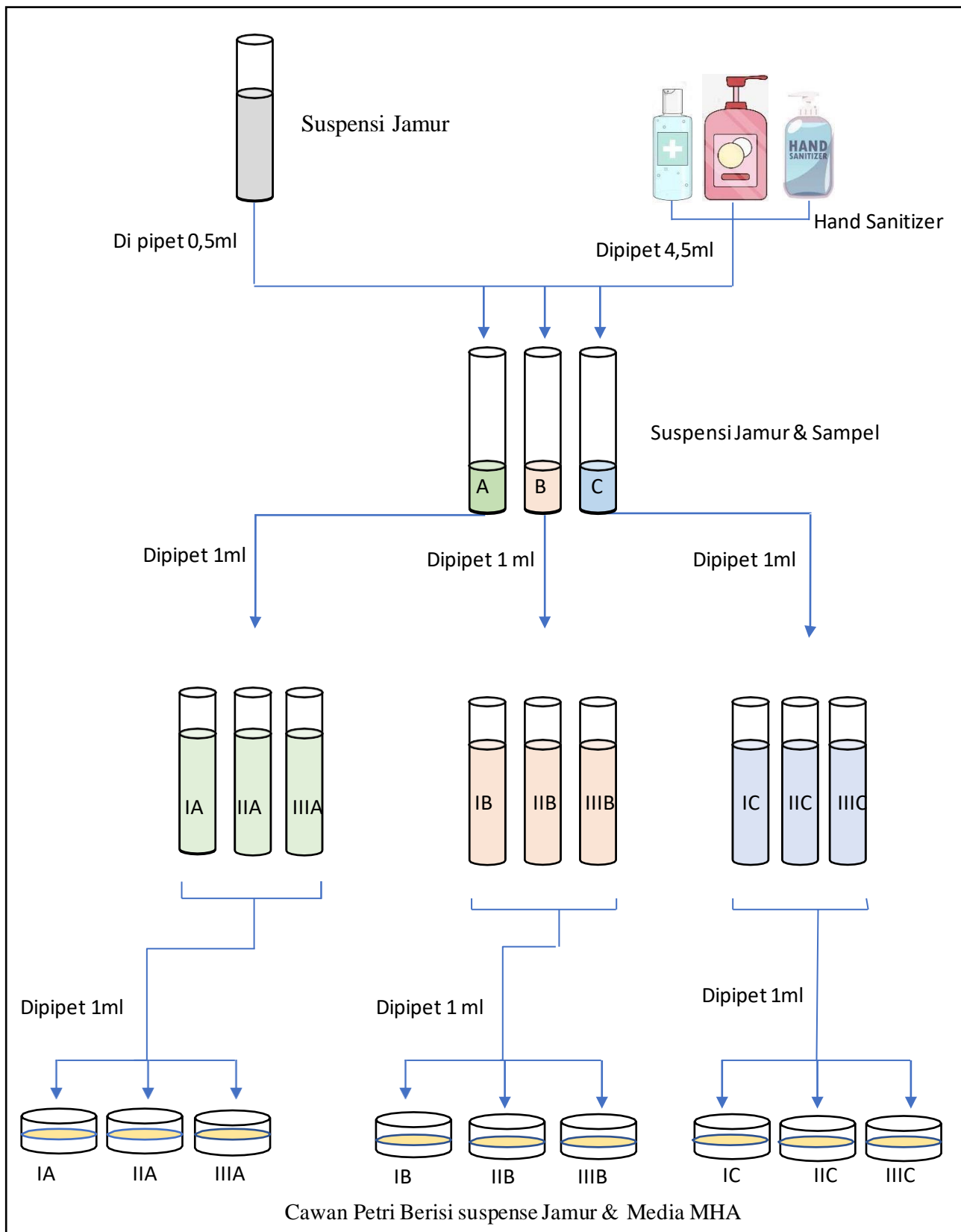
3.6.3 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

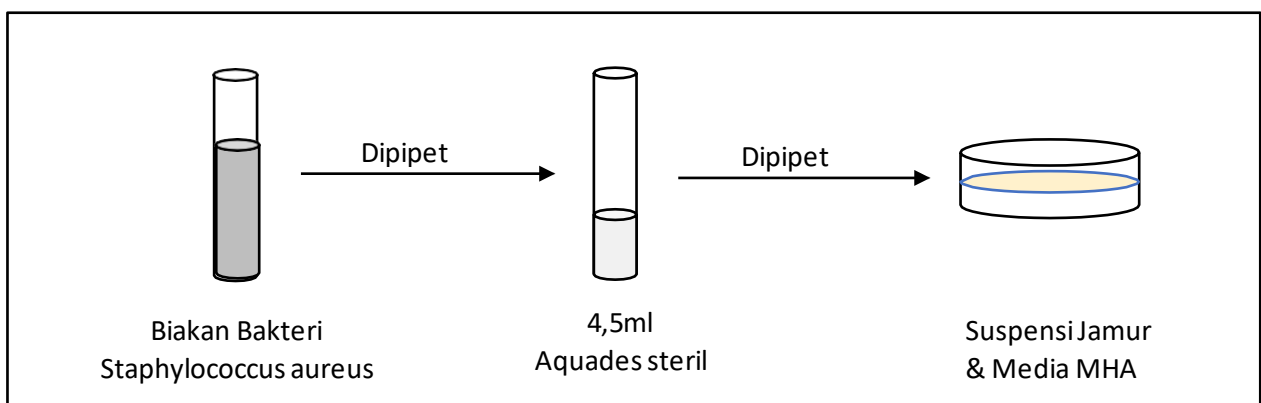
3.7 Metode analisis

Metode yang digunakan adalah percentage kill. Pertama dilakukan penentuan Colony Forming Unit (CFU). Satu koloni biakan murni bakteri staphylococcus aureus diambil dengan menggunakan ose steril dari kultur bakteri, delanjutnya disuspensikan dalam tabung yang berisi 10ml NaCL 0,9%. Lalu dibuat pengenceran dari suspensi bakteri tersebut kedalam 9 tabung yang berisi NaCl 0,9%. Dipipet 1 ml dari setiap tabung pengenceran. Diinkubasi dalam autoklaf pada suhu 35⁰C selama 1 x 24 Jam. Kemudian dibandingkan dengan kekeruhan yang sama dengan larutan standar MC. Farland.



Gambar 3.2 Cara Kerja Pengujian

Kedua, dilakukan uji percentage kill. Dipipet sebanyak 0,5ml suspense jamur yang kekeruhannya sama dengan larutan standar MC.Farland yang menghasilkan jumlah koloni 100-200 pada penentuan CFU dicampur dengan 4,5ml sampel A. Setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1A yang telah berisi 9ml akuades steril. Sebanyak 0,5ml suspense jamur dan 4,5 ml sampel B dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1B yang telah berisi 9ml akuades steril. Sebanyak 0,5ml suspense jamur dan 4,5 ml sampel C dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1C yang telah berisi 9 ml akuades steril. Masing – masing dibuat tiga kali pengulangan. Sebagai control, sebanyak 0,5ml suspense jamur dicampur dengan 4,5ml aquades dimasukkan kedalam tabung reaksi steril. Kemudian tabung-tabung pengencer di vortex. Kemudian dipipet 1 ml suspense dari setiap tabung dimasukkan ke cawan petri steril dan dituangkan media MHA cair sebanyak 15ml dengan suhu 50⁰C. Cawan petri digoyang membentuk angka delapan diatas permukaan meja agar media dan suspense jamur tercampur rata dan dibiarkan hingga memadat. Diinkubasi selama 1 x 24jam pada suhu 37⁰C.



Gambar 3.3 Gambar Pengujian Kontrol

Control koloni dihitung menggunakan koloni counter yang kemudian hasilnya dibandingkan dengan 0,5 MC farland apabila kekeruhan pengenceran sama dengan MC farland maka control koloni memenuhi persyaratan untuk dijadikan sebagai control. Kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada kontrol dan dihitung

rata-rata jumlah koloni. Kemampuan hand sanitizer dalam membunuh pertumbuhan staphylococcus aureus dilihat dengan menghitung percentage kill.

Dengan rumus : Percentage kill = $\frac{(C-x)}{C} \times 100\%$

Keterangan:

C : Jumlah koloni control

X : Jumlah koloni yang diteliti

Hasil Percentage kill