

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian eksperimental dengan tujuan peneliti akan melakukan pengamatan apakah sampel cairan lensa kontak terdapat cemaran mikroba dengan perbedaan waktu simpan menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK).

3.2 Waktu dan Tempat

Waktu penelitian ini dilakukan pada 8 Januari-23 maret tahun 2024. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, neraca analitik, bunsen, hot plate, pipet volume, mikropipet, bola hisap, colony counter, magnetic Stirrer, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), inkubator, rak tabung.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel cairan lensa kontak, media Plate count Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA), aquades, NaCl 0.9%.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti dalam penelitian ini yaitu :

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (Independen) adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Ridha, 2017). Variabel bebas yang terikat dalam penelitian ini adalah Perbedaan Waktu simpan.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat (Dependen) adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas (Ridha, 2017) . Variabel terikat dari penelitian ini adalah jumlah mikroorganisme dengan metode ALT dan AKK pada sampel cairan lensa kontak.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Metode	Alat	Hasil
1.	Perbedaan waktu simpan	Cairan lensa kontak dilakukan perlakuan setiap minggu	Perlakuan setiap minggu	-	Jumlah koloni dan Jumlah kapang/khamir
2.	Jumlah mikroorganisme pada cairan lensa kontak	Uji cemaran menggunakan metode yang terdiri dari ALT dan AKK	Angka kapang khamir dan angka lempeng total	Colony Counter	Jumlah koloni dan jumlah kapang/khamir

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan untuk penelitian ini dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Prosedur sterilisasi yaitu alat-alat tersebut dibungkus menggunakan kertas steril atau steril pouch sedangkan untuk sterilisasi alat yang atasnya berlobang diberi kapas lalu dibungkus menggunakan kertas steril dan diikat dengan benang. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 90 menit.

3.6.2 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Sebanyak 39 gram serbuk Potato Dextrose Agar (PDA) ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml Aquades steril, Kemudian dipanaskan menggunakan hot plate dan diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai larutan jernih. Larutan masukkan ke dalam erlenmeyer kemudian tutup dengan kapas lalu bungkus

menggunakan kertas steril dan ikat menggunakan benang Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (BPOM, 2011).

3.6.3 Pembuatan Media Plate Count Agar (PCA)

Sebanyak 17,5 gram serbuk Plate Count Agar (PCA) ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml aquades steril, kemudian dipanaskan menggunakan hot plate dan diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai larutan jernih. Larutan masukkan ke dalam erlenmeyer kemudian tutup dengan kapas lalu bungkus menggunakan kertas steril dan ikat menggunakan benang. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (BPOM, 2011).

3.6.4 Pembuatan NaCL 0,9%

Sebanyak 9 gram serbuk NaCl ditimbang dan dilarutkan dengan aquadest 100 ml aquadest steril, dan homogenkan. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C.

3.6.5 Pengenceran Sampel

Tabel 3.2 Pengenceran Sampel

Pengenceran sampel
Larutan NaCl 9 ml yang sudah disiapkan di dalam tabung reaksi ditambahkan 1 ml sampel dan masukkan ke dalam tabung reaksi, hingga diperoleh pengenceran 10^{-1}
Preparasi kedua, Pipet 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dan masukkan ke dalam larutan Nacl 9 ml. Homogenkan sampai diperoleh suspensi pengenceran 10^{-2}
Preparasi ketiga, Selanjutnya pipet 1 ml dari pengenceran 10^{-2} dan masukkan ke dalam tabung reaksi

yang berisi 9 ml NaCl. Homogenkan sampai diperoleh suspensi 10^{-3}
Dari setiap preparasi untuk dilakukan uji ALT. Preparasi dilakukan secara aseptis.

3.6.6 Uji angka Lempeng Total (ALT) Metode tuang

Prosedur penelitian dilakukan berdasarkan metode dari Per Ka BPOM. Metode ALT ini dilakukan secara duplo menggunakan cawan petri yang berdiameter 85-100 mm. Suspensi dari setiap pengenceran dimasukkan ke dalam masing-masing pipet 1 ml kemudian dituang ke dalam cawan petri yang sudah berisi media dan dibuat secara duplo, cawan petri segera digoyang dan diputar sedemikian rupa sehingga suspensi tercampur merata (BPOM, 2011). Setelah itu masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam pada posisi dibalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (Sri & Fadhliani, 2019).

3.6.7 Kapang Khamir (AKK) Metode Tuang Uji Angka

Prosedur Penelitian ini dilakukan berdasarkan metode dari Per Ka BPOM. Metode AKK ini dilakukan secara duplo menggunakan cawan petri yang berdiameter 85-100 mm. Suspensi dari setiap pengenceran dimasukkan ke dalam masing-masing pipet 1 ml kemudian dituang ke dalam cawan petri yang sudah berisi media dan dibuat secara duplo, cawan petri segera digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tercampur merata (BPOM, 2011). Setelah itu masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 25°C selama 18-24 jam pada posisi dibalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (Sri & Fadhliani, 2019).

3.6.8 Perhitungan Koloni

3.6.8.1 Perhitungan Angka Kapang Khamir (AKK)

Cara menganalisis hasil pengujian untuk nilai Angka Kapang Khamir sesuai dengan ketentuan PPOMN (2006) : Cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung dengan jumlah koloni dari

kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dua tingkat pengenceran, Kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang Khamir dalam tiap gram atau mililiter sampel.

Beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut :

- a) Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- b) Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari kedua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal : pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 30 koloni, maka dipilih jumlah koloni pengenceran dibawahnya, maka diambil angka rata-rata dari jumlah koloni kedua pengenceran tersebut. Hasil dinyatakan sebagai Angka Kapang Khamir dalam tiap gram, sampel (misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 30 koloni, maka Angka Kapang Khamir adalah $\frac{6+30}{2} \times 10^{-3} = 18 \times 10^{-3}$)
- c) Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang Khamir perkiraan.
- d) Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah ($<1 \times$ Faktor pengenceran terendah) (Dwisari, 2021).

3.6.8.2 Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT)

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai untuk nilai Angka Lempeng Total

(ALT) sesuai dengan ketentuan PPIMN (2006) yaitu :

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Semua koloni dalam cawan petri dihitung dengan

menggunakan alat penghitung koloni (Colony Counter). Jumlah koloni dihitung rata-rata dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.

- b) Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar 250, dihitung rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
- c) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, jumlah koloni dari masing-masing pengenceran dihitung rata-rata jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, dinyatakan jumlah lebih kecil sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
- d) Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25-250 koloni, dihitung jumlah koloni seperti pada poin a dan poin b diatas, dan dinyatakan sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
- e) Jika jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dalam 2,4, atau 8 sektor. Jumlah koloni dihitung dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, dihitung rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pembagi dan pengencer. Hasil dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram.
- f) Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat = 8×200 (1600), Dikalikan dengan faktor pengenceran dan hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat ($>1600 \times$ faktor pengenceran).
- g) Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, dinyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan faktor pengenceran yang terendah (<10).
- h) Menghitung koloni permabat (Spreader)

Ada 3 macam koloni perambatan pada koloni, yaitu :

- Rantai yang tidak terpisah-pisah
- Perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan perbenihan.
- Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan.

i) Menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka ketiga diganti dengan 0, apabila <5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambah pada angka yang kedua.

Contoh :

523.000 laporkan sebagai 520.000 ($5,2 \times 10^{-5}$)

86.300 laporkan sebagai 84.000 ($8,4 \times 10^{-4}$) (Dwisari, 2021).

3.7 Pengolahan dan Penyajian Data

3.7.1 Penyajian Data

Pengolahan data dilakukan setelah didapatkan hasil penelitian uji cemaran mikroorganisme pada cairan lensa kontak dengan perbedaan waktu menggunakan metode ALT dan AKK. Penyajian data yang akan digunakan adalah tabel, yang akan diuji secara laboratorium.

Tabel 3.3 Pengolahan Data Pengamatan metode Angka Lempeng Total

Waktu simpan	Pengenceran	Jumlah koloni		Rata-rata	Nilai ALT
		Replikasi 1	Replikasi 2		
HO	10^{-1}				
	10^{-2}				
	10^{-3}				
H+1	10^{-1}				
	10^{-2}				
	10^{-3}				
H+2	10^{-1}				
	10^{-2}				
	10^{-3}				

Tabel 3.4 Pengolahan Data Pengamatan metode Angka Kapang Khamir

Waktu simpan	Pengenceran	Jumlah koloni		Rata-rata	Nilai AKK
		Replikasi 1	Replikasi 2		
HO	10^{-1}				
	10^{-2}				
	10^{-3}				
H+1	10^{-1}				
	10^{-2}				

	10^{-3}				
H+2	10^{-1}				
	10^{-2}				
	10^{-3}				

3.7.2 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah jumlah koloni dan kapang khamir. Dari data tersebut, setiap cawan yang ada koloninya dapat dihitung dengan menggunakan alat colony counter. Dimana hasil yang didapat dari perhitungan tersebut maka bisa diketahui apakah sampel cairan lensa kontak terdapat koloni atau tidak. Data yang diperoleh dideskripsikan dalam bentuk tabel serta hasil kesimpulan yang diperoleh dari pengujian AKK dan ALT pada cairan lensa kontak.