

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen dengan desain penelitian *cross sectional*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *hand sanitizer spray* dan variabel terikat adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bivariat dengan *one way analysis of variance*.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang, pada bulan Juni 2022.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### 1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah produk *hand sanitizer spray* yang beredar diaplikasi belanja toko *online*.

##### 2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 produk *hand sanitizer spray* yang telah memenuhi kriteria sampel sebagai berikut:

- a. Botol berbentuk semprot
- b. Kemasan plastik
- c. Berbentuk cair
- d. Tidak ada keterangan telah uji laboratorium terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada kemasan
- e. Volume 30 ml sampai 100 ml

Sepuluh produk *hand sanitizer spray* dilakukan pengujian sebanyak 3 kali pengulangan, dengan perhitungan sebagai berikut:

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(10 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$9(n - 1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$n \geq 24/9$$

$$n \geq 2,66 \text{ dibulatkan menjadi } 3$$

Jadi banyaknya pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah 3 kali.

#### D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 variabel dan definisi operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel bebas: <i>Hand sanitizer spray</i>	Produk dengan kemasan semprot, mengandung bahan aktif pembunuh kuman yang digunakan untuk membersihkan tangan, beredar di aplikasi belanja toko <i>online</i>	Observasi	Visual dan penglihatan	<i>Hand sanitizer spray</i> A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	Nominal
2.	Variabel terikat: Pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dihambat setelah diberi <i>hand sanitizer spray</i> dilihat melalui zona bening disekitar <i>disc</i> .	Zona reader	Jangka sorong	Zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (mm)	Ratio

## E. Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dari hasil penelitian yang dilakukan.

### 1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: tabung reaksi, rak tabung, vorteks, neraca analitik, inkubator, *autoclave*, pinset steril, kapas lidi steril, petri dish, oven, *hote plate*, lampu spritus, *beaker glass*, erlenmeyer, *timer*, aluminium foil dan jangka sorong.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: strain bakteri *Escherichia coli* ATCC25922, aquadest steril, Media Muller -Hinton Agar, Media Nutrient Agar Slant miring, standar mac farland 0,5, Nacl 0,85% aquadest dan *blank disc*, media identifikasi *Esherichia coli* ATCC 25922 Eosin Methylen Blue Agar dan SIM.

### 2. Prosedur Penelitian

#### a. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian ini dibersihkan lalu dibungkus dengan kertas coklat dimasukkan ke dalam *hot air oven*, dipanaskan dengan listrik dengan suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam (Soemarno,2000).

#### b. Pembuatan Media Mueller-Hinton Agar

Ditimbang sesuai kebutuhan yang akan digunakan dibuat mengikuti etiket pada kemasan. sebanyak 12,92 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 ml lalu dilarutkan dengan 340 ml aquadest steril. Kemudian dipanaskan pada *hote plate* hingga larut, selanjutnya sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1 atm. Kemudian tuang ke petri dish dengan ketebalan 4 mm, pada saat hangat biarkan membeku. Saat penyimpanan balik petri dish simpan pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$  media dapat bertahan selama 1 minggu, jika hendak digunakan dikeringkan terlebih dahulu di suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit (Kuswiyanto, 2016).

#### c. Pembuatan Standar Mac Farland

Dibuat dari 0,5 ml 1,175% *barrium chloride dihydrate* ( $\text{BaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ ). Ditambah 99,5 ml asam sulfat 1%, dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditutup rapat agar tidak terjadi penguapan lalu standar kekeruhan ini diukur

dengan menggunakan alat turbidimeter. Dapat disimpan diruang gelap suhu kamar selama 6 bulan, jika ingin digunakan dikocok terlebih dahulu (Kuswiyanto, 2016).

d. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Strain kuman *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan identifikasi terlebih dahulu dengan cara mengambil kuman menggunakan ose lalu dibuat preparat dicat gram kemudian diamati dibawah mikroskop. Setelah itu ditanam ke media perbenihan Eosin Methylen Blue Agar, kemudian diinkubasi suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Koloni terpisah atau tersangka dilakukan pengecatan gram dan diamati dibawah mikroskop, kemudian koloni bakteri terpisah dilakukan penanaman kembali pada media SIM diinkubasi 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

e. Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Strain bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 sebelum dipulas pada media harus dilakukan peremajaan bakteri dengan cara mengambil satu jarum ose biakan murni atau strain murni *Escherichia coli* ATCC 25922 kemudian digoreskan pada media Nutrient Agar miring lalu inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai kemudian diambil koloni dari pertumbuhan media Nutrient Agar miring menggunakan jarum ose lalu disuspensikan kedalam 0,5 ml NB cair inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 4 jam, dibuat 3 peremajaan bakteri di karenakan 3 kali pengulangan.

f. Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang sudah diinkubasi 4 jam kemudian disuspensikan kedalam tabung berisi NaCl 0,85% lalu samakan kekeruhannya dengan standar mac farland 0,5. Jika lebih keruh dari standar mac farland tambahkan NaCl 0,85% sampai kekeruhannya sama dengan standar mac farland 0,5. (Kuswiyanto, 2016).

g. Persiapan Lidi kapas steril dan *blank disc*

Lidi kapas steril dan *blank disc* dibeli secara komersial. Disk cakram disimpan pada suhu -20<sup>0</sup>C, jika hendak digunakan disk cakram didiamkan selama 1 jam di suhu kamar (Kuswiyanto, 2016).

#### h. Cara Kerja Pemeriksaan Uji Daya Hambat *Hand Sanitizer Spray*

Penelitian ini menggunakan kertas cakram atau *blank disc* dilakukan secara aseptik dengan metode Kirby Bauer.

- 1) Peneliti menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- 2) Melakukan quality kontrol terhadap media yang akan digunakan, dengan mengambil satu plate media Mueller-Hinton Agar lalu diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Lalu pada hari ke-2 dilihat kembali media Mueller-Hinton Agar apakah terdapat koloni bakteri yang tumbuh atau tidak, media yang baik tidak ada koloni bakteri yang tumbuh.
- 3) Media Mueller-Hinton Agar yang akan digunakan diukur terlebih dahulu dengan jarak antar disk 20mm diberikan tanda menggunakan spidol sebagai tanda untuk diletakkannya disk dan diberikan label ditempelkan pada petri dish. Petri dish dengan diameter 10 cm di letakkan 4 disk berbeda dari masing-masing *hand sanitizer* yang akan diujikan
- 4) Siapkan beaker glass yang sudah diberikan kertas disk di dalamnya
- 5) *Hand sanitizer* yang akan diujikan sebelum dibuka didesinfeksi terlebih dahulu menggunakan kapas alkohol
- 6) Buka tutup *hand sanitizer* dengan perlahan kemudian segera tuang ke dalam beaker glass yang berisi kertas disk tuangkan *hand sanitizer* hingga dapat merendam kertas disk. Untuk kontrol positif tuangkan *hand sanitizer spray* yang sudah teruji laboratorium sedangkan kontrol negatif tuangkan aquades steril
- 7) Segera tutup rapat beaker glass menggunakan aluminium foil
- 8) Kemudian rendam selama 15 menit (gunakan *timer*)
- 9) Lidi steril dicelupkan kedalam suspensi bakteri yang sebelumnya sudah disamakan kekeruhannya dengan standar mac farland, peras lidi kapas steril pada dinding tabung
- 10) Goreskan secara merata pada media Mueller-Hinton Agar hingga merata ke seluruh permukaan media
- 11) Kemudian biarkan selama 5 menit agar meresap
- 12) Selanjutnya ambil kertas disk dari dalam beaker glass menggunakan pinset steril kemudian letakkan pada media Mueller-Hinton Agar

- 13) Media Mueller-Hinton Agar yang telah ditempel diks dimasukkan ke dalam inkubator Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 14) Pekerjaan dikerjakan 3 sesi dalam 1 kali pengulangan agar pekerjaan yang dilakukan tidak terburu-buru
- 15) Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan dicatat dalam satuan mm
- 16) Interpretasi penentuan kategori respon hambatan pertumbuhan bakteri dapat di lihat pada tabel 3.3

Tabel 3.2 Klasifikasi rata-rata zona bening terhadap respon hambat pertumbuhan bakteri oleh Greenwood

Respon Hambatan Pertumbuhan	Diameter Zona Hambat
Kuat	>20 mm
Sedang	16-20 mm
Lemah	10-15 mm
Sangat lemah	<10 mm

Sumber: (Purbosari, 2021)

## F. Pengolahan dan Analisis data

### 1. Pengolahan data

Data didapatkan dari pengukuran diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong, setelah didapat diameter zona hambat dari masing-masing *hand sanitizer spray* yang diujikan maka dilakukan pengumpulan data secara univariat.

### 2. Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara bivariat dengan menggunakan alat bantu berupa perangkat SPSS 26 digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata antar diameter zona hambat menggunakan uji statistik *one way analysis of variance* (ANOVA) apabila terdapat perbedaan nyata dilanjut dengan uji beda nyata terkecil pada taraf 5% atau tingkat kepercayaan 95%.