

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif dengan melihat efek antibakteri *hand sanitizer* terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* yang dibandingkan dengan kontrol positif (*hand sanitizer* yang memiliki izin edar).

B. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh produk *hand sanitizer* yang beredar di *marketplace* S sejumlah 53 produk *hand sanitizer* yang terjual di *marketplace* tersebut.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah produk *hand sanitizer* yang beredar di *marketplace* S dengan melakukan pencarian dengan kata kunci *hand sanitizer* pada *marketplace* S yang memenuhi kriteria inklusi. Penelitian ini menggunakan teknik *sampling Purposive Sampling* agar sampel yang dipilih dapat memenuhi kriteria yang diinginkan sesuai dengan populasi yang ada. Kriteria inklusi sampel pada penelitian ini yaitu :

- a. Produk *hand sanitizer* ketika diketik kata kunci '*hand sanitizer*' di dalam kolom pencarian
- b. *Hand sanitizer* yang tidak memiliki izin edar Kemenkes RI
- c. *Hand sanitizer* dengan bentuk sediaan spray
- d. *Hand sanitizer* yang memiliki nama produk pada kemasan

Sehingga diperoleh enam produk *hand sanitizer* yang memenuhi kriteria inklusi.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 30 Desember 2021. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Steril Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan pengujian daya hambat bakteri. Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan April tahun 2022.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kaca objek, kapas steril, ose bulat, ose jarum, lampu spirtus, botol semprot, mikroskop, kertas buram, oven, autoklaf, inkubator, pinset, erlenmeyer 100 ml, beaker glass 1000 ml, beaker glass 100 ml, labu ukur 50 ml, alumunium foil, *hot plate*, cawan petridis, tabung reaksi, spatula, jangka sorong, batang pengaduk, disc kosong.

2. Bahan

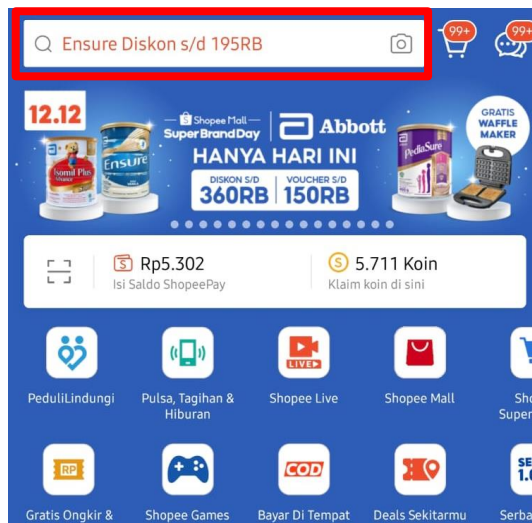
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel *hand sanitizer*, aquadest, kontrol positif *hand sanitizer* yang memiliki izin edar, larutan gram A (kristal violet), gram B (lugol), gram C (etanol 96%), dan gram D (safranin), media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Blood Agar Plate* (BAP) NaCl 0,9%, H₂ SO₄ 1%, BaCl 1%.

E. Prosedur Kerja Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di *marketplace* S dengan mengambil tiga produk *hand sanitizer* spray yang tidak memiliki izin edar pada tanggal 30 Desember 2021.

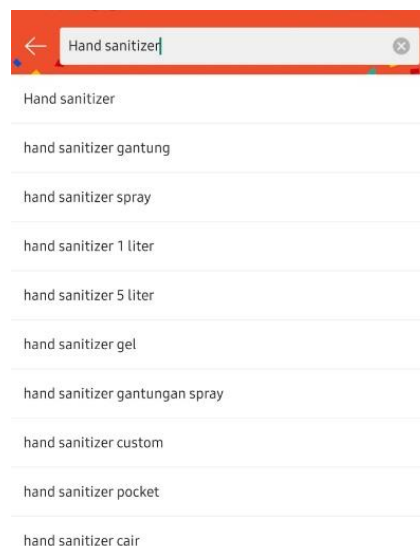
a. Membuka aplikasi *marketplace* S



Sumber : *marketplace* S

Gambar 3.1 Halaman Utama *marketplace* S.

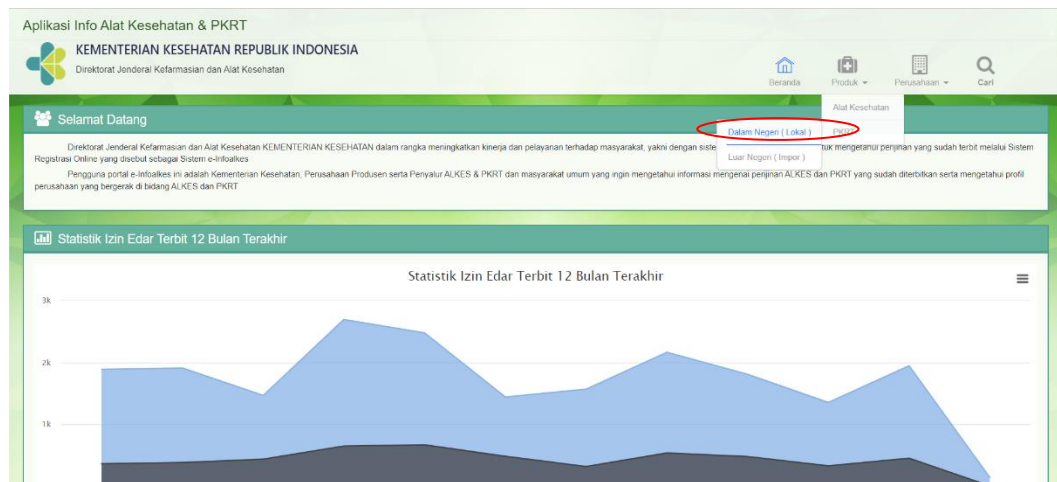
b. Pada kolom pencarian dimasukkan kata kunci '*hand sanitizer*'



Sumber : *marketplace* S

Gambar 3.2 Kolom pencarian.

- c. Melakukan perankingan pada produk *hand sanitizer* yang memenuhi kriteria inklusi
- d. Melakukan pencarian nama produk dengan kategori produk PKRT di laman *website* Kemenkes RI <http://infoalkes.kemkes.go.id/> untuk melihat izin edar.



Sumber : <http://infoalkes.kemkes.go.id/>

Gambar 3.3 Cek Izin Edar.

- e. Melakukan *check out* produk pada *marketplace* S
2. Isolasi Bakteri *Stahpylococcus aureus*
 - a. Hari pertama, penanaman bakteri uji pada media NB selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
 - b. Hari kedua, spesimen ditanam pada media isolasi Blood Agar Plate (BAP) dan Nutrient Agar Plate (NAP) lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
 - c. Hari ketiga, koloni tersangka *Staphylococcus aureus* pada media BAP memiliki ciri kultur yaitu koloninya sedang – besar, *smooth*, keping, berwarna putih – kuning sedangkan pada media NAP memiliki ciri kultur koloni berwarna putih – kuning, *smooth*, keping, cukup subur
 3. Pewarnaan Gram
 - a. Dibersihkan kaca objek dengan kapas alkohol 70% lalu difiksasi
 - b. Diberikan tanda pada bagian belakang kaca objek dengan menggunakan spidol
 - c. Ditetaskan NaCl 0,9% pada kaca objek

- d. Dipijarkan ose bulat pada lampu spiritus kemudian diambil 2-3 ose bakteri dari tabung, lalu diratakan pada bagian depan kaca objek yang telah diberi tanda.
- e. Difikasi kaca objek diatas lampu spiritus 2-3 kali hingga sampel kering, kemudian didiamkan hingga dingin
- f. Ditetaskan gram A (kristal violet) sebagai pewarna utama pada preparat dan tunggu selama ± 1 menit lalu dibilas dengan aquadest mengalir
- g. Ditetaskan gram B mordant (*lugol's iodine*) dan ditunggu ± 1 menit lalu dibilas dengan aquadest mengalir
- h. Ditetaskan gram C (etanol 96%) setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih lalu dibilas dengan aquadest mengalir
- i. Ditetaskan gram D (fuschin) dan ditunggu ± 45 detik lalu dicuci dengan aquadest mengalir
- j. Dikeringkan preparat dengan dibiarkan mengering di udara. Diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali yang ditetesi dengan minyak anisol.

4. Sterilisasi Alat

Peralatan berbahan gelas yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir lalu dikeringkan. Kemudian alat dibungkus dengan kertas buram lalu disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 160°C selama 1 jam (Rahmawati, 2019:177). Untuk alat berbahan logam seperti ose dan pinset dilakukan pemijaran dengan api langsung. Sterilisasi pada media dan aquadest dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditutup dengan kapas dan alumunium foil. Disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

5. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 38,0 gram media MHA disuspensikan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih selama 1 menit kemudian ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu disterilkan dengan autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Setelah itu, dibiarkan media hingga agak dingin sekitar suhu $40-45^{\circ}\text{C}$, lalu dituang ke dalam cawan petri (Safitri dan Novel, 2010:47).

6. Pembuatan Media *Nutrient Agar Slant* (NAS)

Sebanyak 23,0 gram media NA disuspensikan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih selama 1 menit kemudian ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu disterilkan dengan autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Setelah itu, dibiarkan media hingga agak dingin sekitar suhu 40-45°C, lalu dituang ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan (Safitri dan Novel, 2010:79).

7. Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB)

Sebanyak 8,0 gram media NB disuspensikan ke dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih selama 1 menit kemudian ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu disterilkan dengan autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Setelah itu, dibiarkan media hingga agak dingin sekitar suhu 40-45°C, lalu dituang ke dalam tabung reaksi (Safitri dan Novel, 2010:81).

8. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

BaCl 1% sebanyak 0,05 ml dicampur dengan H₂ SO₄ 9,95 ml, lalu dikocok hingga homogen (Dalynn Biologicals, 2014).

9. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan ke media agar miring *Nutrient Agar Slant* (NAS) dengan cara diambil sebanyak satu mata jarum ose secara aseptis lalu diinokulasikan dengan menggores pada medium agar miring. Selanjutnya, diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C (Muharni, Fitrya, Farida, 2017).

10. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji yang telah diremajakan di media NAS diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 5 ml media NB kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri tersebut dibandingkan kekeruhannya larutan standar Mc.

Farland 0,5. Apabila suspensi bakteri keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril, jika kurang keruh ditambahkan bakteri hingga kekeruhannya sama. (Mpila, Fatmawali, Wiyono, 2012).

11. Pengujian Daya Hambat Bakteri

Pengujian antibakteri dengan metode Kirby-Bauer (Kusharyati dan Widodo, 2019:3.20)

- a. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Dichelupkan *cotton swab* dalam biakan bakteri kemudian tekan kapas ke sisi tabung agar air tiris
- c. Diulaskan pada seluruh permukaan cawan petri Mueller Hinton Agar secara merata
- d. Dibiarkan cawan petri selama 5 menit
- e. Dichelupkan kertas cakram dalam larutan *hand sanitizer*
- f. Diangkat kertas cakram, dibiarkan sejenak agar tiris, selanjutnya kertas cakram diletakkan pada permukaan agar
- g. Ditekan kertas cakram menggunakan pinset agar menempel sempurna di permukaan media
- h. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- i. Setelah 24 jam, diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm)

F. Pengumpulan Data

Pengujian aktivitas antibakteri pada setiap sampel *hand sanitizer* dengan dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada daerah bening di sekitar disk. Daerah zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) yang kemudian didokumentasikan dan dicatat di lembar pengumpulan data.

G. Pengolahan dan Analisis Data

Pada penelitian ini digunakan analisis data univariat dimana jenis data yang dihasilkan adalah skala numerik dan kategorik. Pada umumnya analisis univariat dilakukan hanya untuk melihat gambaran dari variabel yang diteliti baik data kategorik maupun data numerik.