

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium 7 & 8 (Lab.Bakteriologi) Universitas Setia Budi Surakarta Jl. Let. Jen. Sutoyo Surakarta. Waktu penelitian dilakukan pada 14 Januari-21 Januari 2019.

3.2 Obyek Penelitian

Obyek pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel desinfektan A, B & C.

3.3 Teknik Penelitian

Teknik pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji koefisien fenol.

3.4 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah desinfektan yang tidak bermerk dan yang bermerk. Sampel yang digunakan adalah 3 sampel desinfektan dan 1 sampel fenol sebagai standard yang melakukan pemeriksaan di Laboratorium 7 & 8 (Lab.Bakteriologi) Universitas Setia Budi Surakarta.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah desinfektan yang digunakan untuk pemeriksaan.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penentuan angka koefisien fenol berbagai desinfektan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

- a. Tabung reaksi steril
- b. Rak tabung reaksi
- c. Pipet volume
- d. Spirtus
- e. Ose
- f. Korek api
- g. Erlemeyer
- h. Timbangan
- i. Spatel

3.6.2 Bahan

- a. Desinfektan A,B&C
- b. Fenol
- c. Aquadest
- d. Media PSA
- e. Media KIA, SIM , LIA & CITRAT
- f. Media BHI

3.7 Cara Kerja

3.7.1 Pembuatan Fenol

1. Ditimbang 5 gr kristal fenol.
2. Ditambahkan 100 ml aquadest.

3. Larutan fenol siap untuk digunakan.

3.7.2 Pembuatan media PSA (*Pseudomonas* Selektif Agar)

1. Ditimbang serbuk media PSA sebanyak 2,06 gr.
2. Dilarutkan media PSA dengan aquadest 35 ml.
3. Dipanaskan media hingga mendidih sambil diaduk.
4. Dituang media yang telah mendidih kedalam tabung reaksi 10 ml.
5. Disterilkan media dengan autoclave pada suhu 121⁰ selama 5 menit.

3.7.3 Pembuatan Media BHI (*Brain Heart Infusion*)

1. Ditimbang serbuk media BHI sebanyak 23,48 gr.
2. Dilarutkan media BHI dengan aquadest 640 ml.
3. Dipanaskan media hingga mendidih sambil diaduk.
4. Dituang media yang telah mendidih kedalam tabung reaksi 10 ml.
5. Disterilkan media dengan autoclave pada suhu 121⁰ selama 5 menit.

3.7.4 Inokulasi *Pseudomonas aeruginosa*

1. Diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* kedalam cawan petri yang berisi media *Pseudomonas* Selektif Agar (PSA) didalam entkas secara aseptis.
2. Diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
3. Diamati hasil goresan.

3.7.5 Uji Biokimia *Pseudomonas aeruginosa*

1. Diinokulasikan biakan uji pada media :
 - KIA = dengan cara menusuk dan menggores
 - SIM = dengan cara menusuk

LIA = dengan cara menusuk dan menggores

CITRAT = dengan cara menggores

2. Diinkubasi semua media pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Diamati hasilnya, misal perubahan warna media atau dengan penambahan reagen tertentu.

3.7.6 Pengenceran Desinfektan 5 %

1. Dibuat seri pengenceran desinfektan 1:60 sampai dengan 1:130 dengan aquadest steril, sehingga diperoleh konsentrasi desinfektan tertentu dengan volume desinfektan tiap tabung 5 ml.

Tabel 1. Pengenceran Desinfektan 5 %.

Desinfektan	Pengencer	Keterangan	Volume	Konsentrasi
2 ml	4 ml	1 ml dibuang	5 ml	1 : 60
2 ml	5 ml	2 ml dibuang	5 ml	1 : 70
2 ml	6 ml	3 ml dibuang	5 ml	1 : 80
2 ml	7 ml	4 ml dibuang	5 ml	1 : 90
1 ml	4 ml	-	5 ml	1:100
1 ml	4.5 ml	0.5 ml	5 ml	1:110
1 ml	5.0 ml	1.0 ml	5 ml	1:120
1 ml	5.5 ml	1.5 ml	5 ml	1:130

2. Diisi 1 ml suspensi biakan *Pseudomonas aeruginosa* lalu didiamkan 5 menit, setiap tabung desinfektan dan mendiamkan dengan waktu kontak 5 menit dan 10 menit.
3. Setelah waktu kontak 5 menit, diambil 2 ose dari tiap tabung desinfektan lalu inokulasikan kedalam media BHI.
4. Setelah waktu kontak 10 menit, diambil 2 ose dari tiap tabung desinfektan lalu di inokulasikan kedalam media BHI.
5. Diinkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Diamati ada tidaknya pertumbuhan yaitu kekeruhan pada tiap tabung dan ditentukan koefisien fenol dari desinfektan uji.

3.7.7 Pengenceran Fenol 5 %

1. Dibuat seri pengenceran fenol 1:60 sampai dengan 1:130 dengan aquadest steril, sehingga diperoleh konsentrasi fenol dengan volume tiap tabung 5 ml.

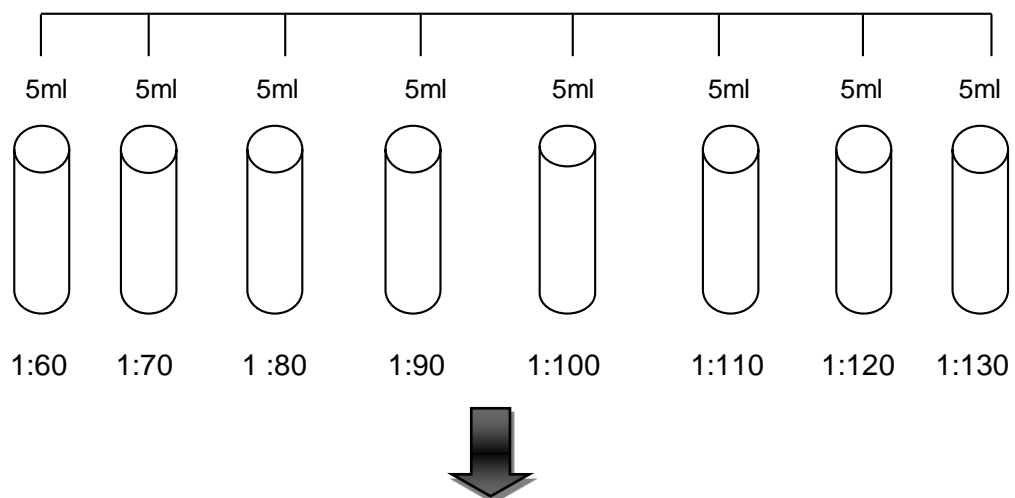
Tabel 2. Pengenceran Fenol 5 %.

Fenol	Pengencer	Keterangan	Volume	Konsentrasi
2 ml	4 ml	1 ml dibuang	5 ml	1 : 60
2 ml	5 ml	2 ml dibuang	5 ml	1 : 70
2 ml	6 ml	3 ml dibuang	5 ml	1 : 80

2 ml	7 ml	4 ml dibuang	5 ml	1 : 90
1 ml	4 ml	-	5 ml	1 : 100
1 ml	4.5 ml	0.5 ml	5 ml	1 : 110
1 ml	5.0 ml	1.0 ml	5 ml	1 : 120
1 ml	5.5 ml	1.5 ml	5 ml	1 : 130

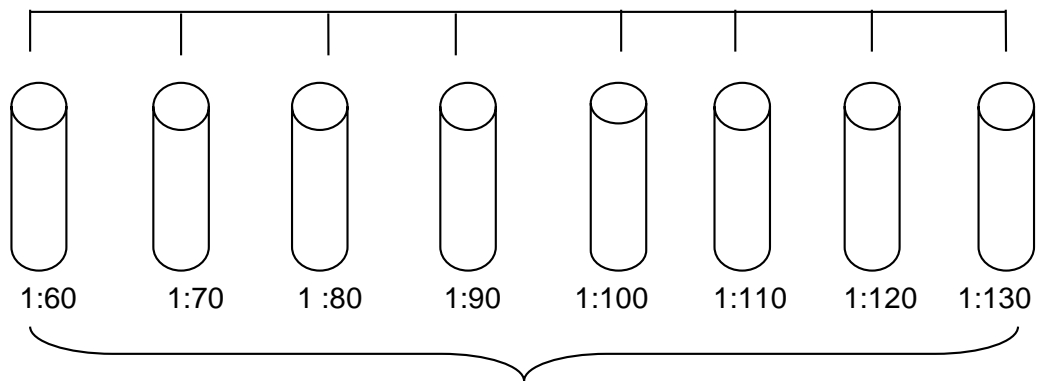
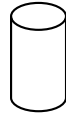
2. Diisi dengan 1 ml suspensi biakan *Pseudomonas aeruginosa* lalu didiamkan 5 menit dan didiamkan dengan waktu kontak 5 menit dan 10 menit.
3. Setelah waktu kontak 5 menit, diambil 2 ose dari tiap tabung fenol lalu diinokulasikan ke dalam media BHI.
4. Setelah waktu kontak 10 menit, diambil 2 ose dari tiap tabung fenol lalu diinokulasikan ke dalam media BHI.
5. Diinkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Diamati ada tidaknya pertumbuhan yaitu kekeruhan pada tiap tabung dan ditentukan pengenceran tertinggi fenol.

3.7.8 Pengenceran Desinfektan Secara Skematis



Pseudomonas aeruginosa

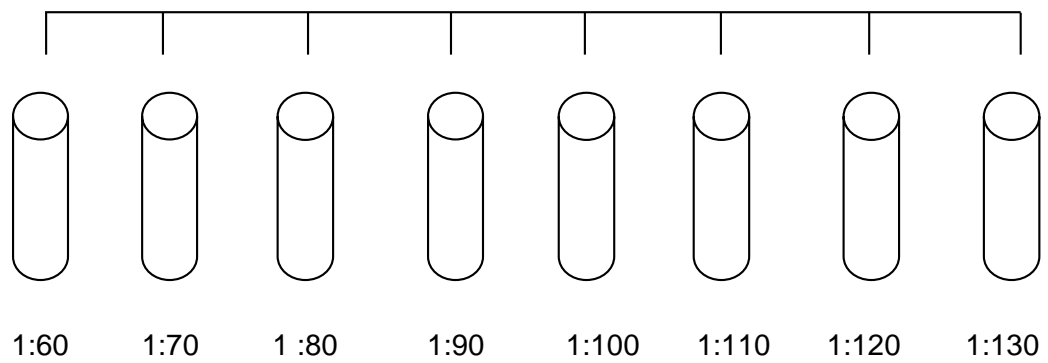
1 ml

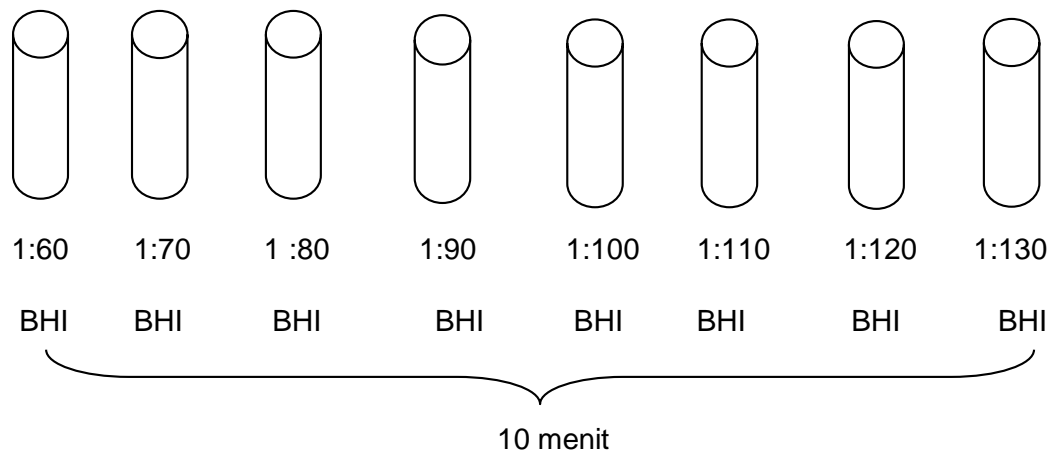
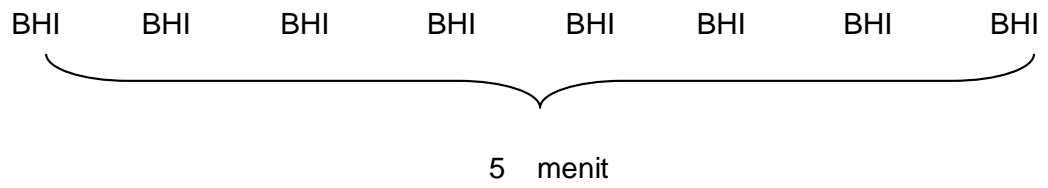


Didiamkan 5 menit



Diambil 2 ose

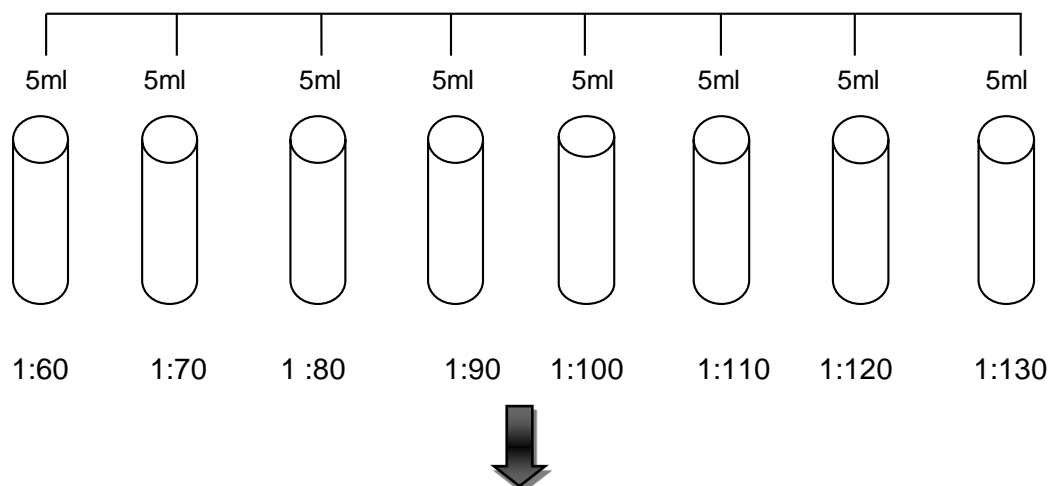




Diinkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 24 jam

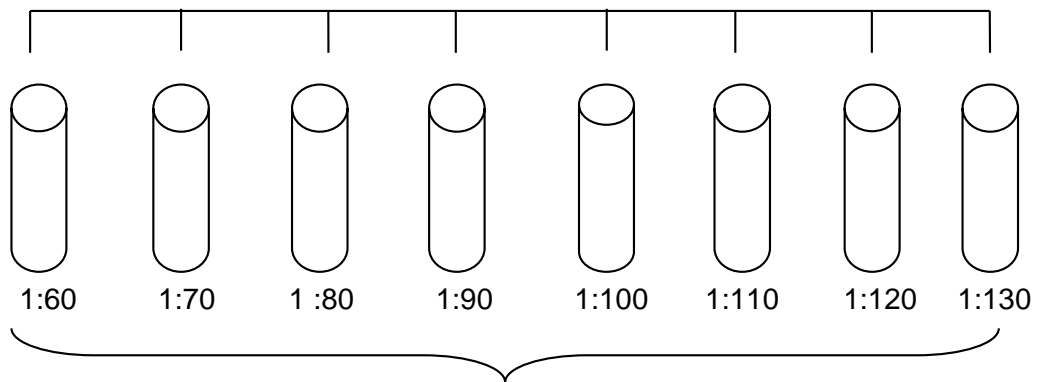
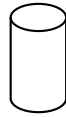
Diamati apabila Keruh = (+) dan Jernih (-)

3.7.9 Pengenceran Fenol Secara Skematis



Pseudomonas aeruginosa

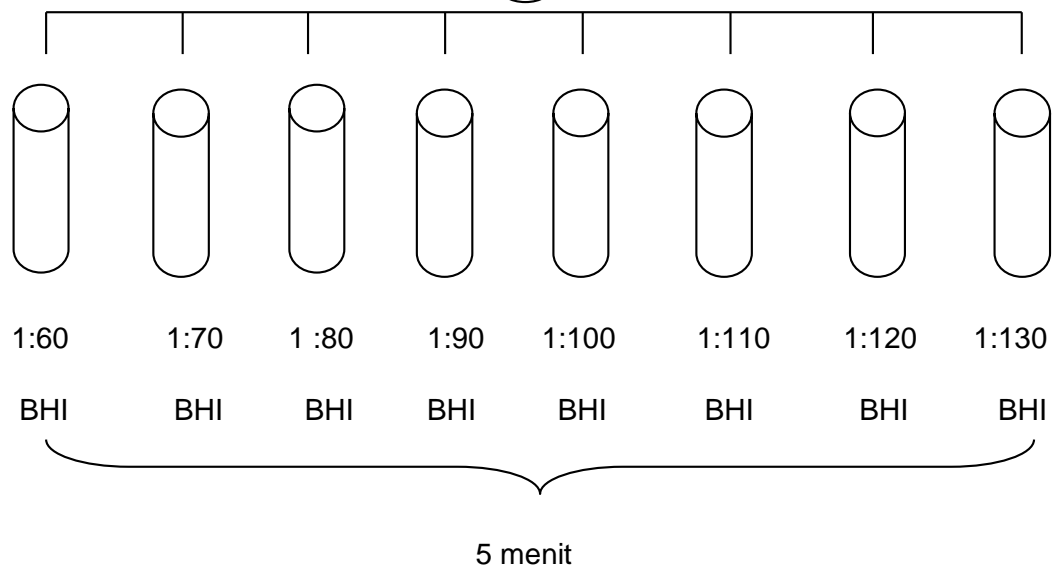
1 ml

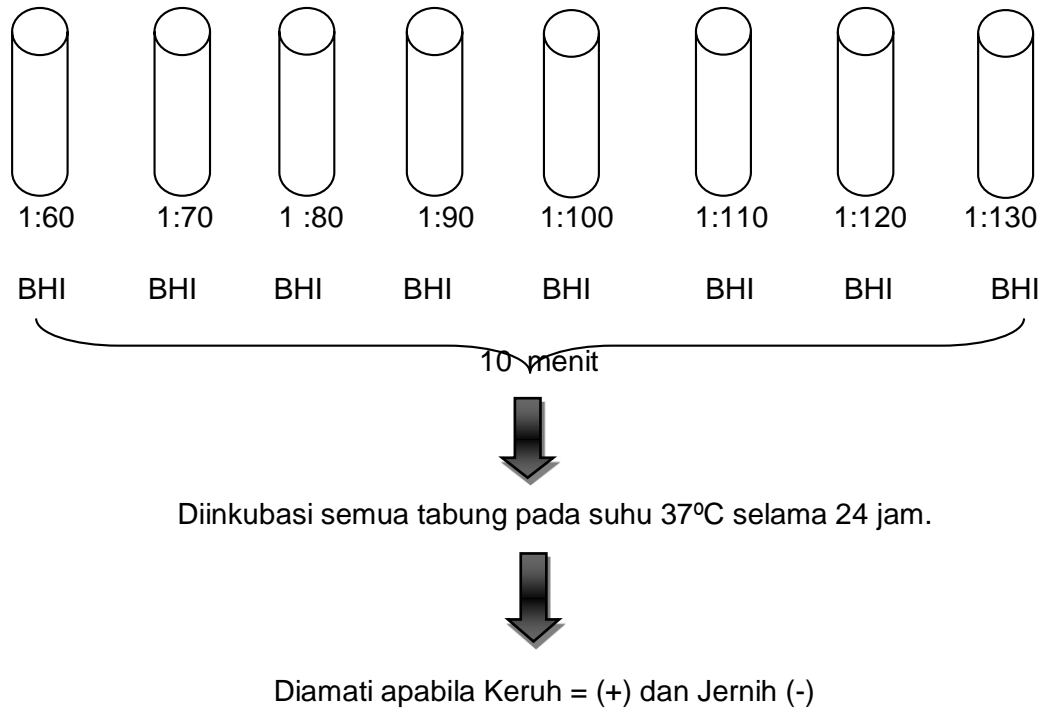


Didiamkan 5 menit



2 ose





3.8 Rumus Perhitungan

Perhitungan koefisien fenol dilakukan sebagai berikut : (Radji, 2007).

$$\text{Koefisien fenol} = \frac{a}{b} + \frac{c}{d} : 2$$

Keterangan :

a= pengenceran tertinggi suatu desinfektan yang dapat membunuh bakteri uji dalam waktu 5 menit.

b= pengenceran tertinggi fenol yang dapat membunuh bakteri uji dalam waktu 5 menit.

c= pengenceran tertinggi suatu desinfektan yang dapat membunuh bakteri uji dalam waktu 10 menit.

d= pengenceran tertinggi fenol yang dapat membunuh bakteri uji dalam waktu 10 menit.

