

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang di gunakan dalam produk ini adalah krim pemutih (*Whitening krim*)

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi. Sampel yang di gunakan pada penelitian ini adalah krim pemutih (*whitening krim*) yang di peroleh dari beberapa pasaran online.

#### **B. Variable Penelitian**

##### **1. Identifikasi variable utama**

Variabel utama memuat identifikasi dari semua sampel yang di teliti langsung. Variabel utama dan penelitian ini adalah uji mikrobiologis patogen beberapa krim pemutih yang beredar di pasaran online.

##### **2. Klarifikasi variable utama**

Variabel utama yang telah didefinisikan terdahulu dapat di klarifikasi kedalam berbagai macam variable yaitu variable bebas, variable kendali, variable tergantung.

Variabel bebas yang di maksud dalam penelitian ini adalah variable yang sengaja di ubah-ubah untuk di pelajari pengaruhnya terhadap variable tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah uji mikrobiologis patogen beberapa krim pemutih yang beredar di pasaran online.

Variable kendali adalah variable yang dianggap berpengaruh terhadap variable tergantung tergantung selain variable bebas, sehingga perlu di tetapkan kualifikasinya agar hasil yang di dapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tetap. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah uji makroba patogen, sterilitas, media yang di gunakan, waktu inkubasi suhu, kondisi laboratorium, peralatan, penelitian, serta metode angka lempeng total.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan criteria penelitian ini. variable tergantung dalam penelitian ini adalah zona, daya hambat yang terbentuk.

### **3. Definisi operasional variable utama**

**Pertama**, mikroba patogen merupakan mikroba yang sangat berbahaya jika beradapa disediaan farmasi salah satunya di krim pemutih.

**Kedua**, krim pemutih merupakan bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai.

**Ketiga**, mikroba uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *candida albicans*. Mikroba patogen ini dapat menyebabkan infeksi pada kulit jika terdapat pada krim pemutih.

**Keempat**, isolasi mikroba adalah mikroba yang tumbuh dan di peroleh dari media uji.

**Kelima**, identifikasi mikroba adalah di lakukan secara makroskopis yang di peroleh dari hasil isolasi pada media uji.

### **C. Bahan dan Alat**

Alat yang yang di pakai yaitu autoklaf (Smic Model YX-280 B), botol pengenceran, cawan petri, gelas erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, incubator, laminari air flow, lampu spiritus, lumping dan alu ose, oven, sendok tanduk, tabung reaksi, dan timbangan analitik.

Bahan yang di gunakan yaitu air suling, alkohol 70%, kapas, kalium telurit, medium Nutrium Agar (NA), Potato Sucrose Agar (PSA), Sabour Glikosa Agar (SGA), Vogel Johnson Agar (VJA), produk krim pemutih, dan tween 80.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Sterilisasi alat dan bahan/media**

Alat-alat yang diperlukan dicuci dengan deterjen. Wadah dengan mulut lebar dibersihkan dengan merendamnya dalam deterjen selama 15–30 menit diikuti dengan pembilasan, mula-mula dengan air bersih, terakhir dengan air suling. Alat-alat dikeringkan dengan posisi terbalik di udara terbuka. Setelah kering dibungkus dengan kertas perkamen. Tabung reaksi dan gelas Erlenmeyer terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih. Alat-alat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu  $180^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam.. Jarum ose disterilkan dengan pemanasan langsung hingga memijar selama 30 menit (Dwidjoseputro, 1978).

#### **2. Perlakuan Pengambilan sampel**

Sampel berupa produk krim pemutih yang diambil secara acak pada beberapa toko online.

### 3. Pengenceran sampel

Diambil masing-masing sampel krim pemutih sebanyak 1 gram secara aseptis dan dimasukkan ke dalam botol pengencer steril. Ditambahkan 1 ml tween 80 steril lalu diaduk sampai homogen, masing-masing ditambahkan air suling sampai 10 ml sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$  kemudian pengenceran dilanjutkan dengan mengambil 1 ml hasil pengenceran  $10^{-1}$  dimasukkan kedalam botol pengencer yang berisi 9 ml air suling, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ , dibuat hingga pengenceran  $10^{-3}$

### 4. Pengujian

**4.1 Penentuan Angka Lempeng Total (ALT).** Masing-masing pengenceran ( $10^{-1}$ ), ( $10^{-2}$ ), ( $10^{-3}$ ), dipipet 1 ml, lalu dimasukkan kedalam cawan petri yang telah disterilkan dengan metode tuang. Ke dalam masing-masing cawan petri di tuang Medium Nutrien Agar (NA) sebanyak 10 ml, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Setelah padat diinkubasikan dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 x 24 jam. Diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh serta dihitung jumlahnya. Pengerjaan dilakukan secara duplo.

**4.2 Perhitungan Angka Lempeng Total.** Pembacaan pertumbuhan koloni yang tumbuh pada media Nutrium agar.

1. Jumlah koloni yang dipilih dan dihitung tiap cawan 30-300
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, maka dihitung sebagai satu koloni.

3. Suatu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni (Bpom, 2011).

**4.3 Penentuan Angka kapang kamir secara SPC (*Standard Plate Count*).** Dari masing-masing pengenceran ( $10^{-1}$ ), ( $10^{-2}$ ), ( $10^{-3}$ ), dipipet 1 ml, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah disterilkan dengan metode tuang. Ke dalam masing-masing cawan petri dituang Sabour Glikosa Agar (SGA), sebanyak 10 ml kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Setelah padat diinkubasikan dengan posisi terbalik pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Diamati ada tidaknya koloni kapang yang tumbuh serta dihitung jumlah koloni tiap gramnya.

**4.4 Perhitungan Angka Kapang Kamir.** Cara menghitung Angka Kapang Kamir berdasarkan BPOM 2011, koloni yang tumbuh pada tiap pengenceran yang digunakan kemudian tentukan angka jamur yang tumbuh dengan kriteria berikut:

1. Apabila jumlah koloni antara 15-150 CFU dari cawan pada tiap pengenceran sama, maka jumlah koloni dari cawan dihitung kemudian di kali faktor pengenceran.
2. Apabila jumlah koloni antara 15-150 CFU dari cawan petri dua tingkat faktor pengenceran dan digunakan angka rata-rata.
3. Hasil tersebut dinyatakan sebagai angka jamur kapang dan kamir per gram sampel (Bpom, 2011).

**4.5 Identifikasi *Staphylococcus aureus*.** Siapkan alat yang sudah di strerilisasi, dilakukan pengerjaan secara aseptik. Tuangkan 10 ml medium Vogel

Johnson Agar (VJA) dan dibiarkan memadat, ambil ose bulat dan panaskan diatas lampu spiritus hingga panas (memijar). Dengan satu ose bulat tadi di ambil sampel uji positif krim pemutih yang sudah di encerkan di gores pada mediumVJA. Diinkubasi pada incubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 x 24 jam.

**4.6 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*.** Siapkan alat yang sudah di strerilisasi, dilakukan pengerjaan secara aseptik. Tuangkan 10 ml medium Pseudomonas Sucrose Agar (PSA) dan dibiarkan memadat, ambil ose bulat dan panaskan diatas lampu spiritus hingga panas (memijar). Dengan satu ose bulat tadi di ambil sampel uji positif krim pemutih yang sudah di encerkan di gores pada medium PSA. Diinkubasi pada incubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 x 24 jam.

**4.7 Identifikasi *Candida albicans*.** Siapkan alat yang sudah di strerilisasi, dilakukan pengerjaan secara aseptik. Tuangkan 10 ml medium Sabour Glikosa Agar (SGA) dan dibiarkan memadat, ambil ose bulat dan panaskan diatas lampu spiritus hingga panas (memijar). Dengan satu ose bulat tadi di ambil sampel uji positif krim pemutih yang sudah di encerkan di gores pada medium SGA. Diinkubasi pada incubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 3 x 24 jam.

## **E. Analisis Hasil**

Hasil penelitian beberapa merk krim pemutih terhadap mikrobiologi patogen. di hitung koloni bakteri secara KLT dan AKK. untuk melihat bakteri patogen dilakukan oles menggunakan ose lalu di taruh di media selama 24-72 jam.