

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah krim pemutih wajah tanpa izin edar dan antibiotik.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah krim pemutih wajah tanpa izin edar, dan antibiotik ampicilin, vankomisin, klindamisin, gentamisin, siprofloksasin, meropenem, dan piperasilin-tazobaktam.

B. Variabel Penelitian

1. Klasifikasi variable utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah 10 krim pemutih wajah tanpa izin edar dan jenis antibiotik ampicilin, vankomisin, klindamisin, gentamisin, siprofloksasin, meropenem, dan piperasilin-tazobaktam.

Variabel terkontrol yaitu variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil bisa diulangi peneliti lain dengan tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pengerjaannya yang aseptis, media, proses sterilisasi, kondisi laboratorium, suhu dan waktu inkubasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini dan memberikan respon jika dihubungkan dengan variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji mikrobiologis meliputi uji ALT, AKK, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan

Candida albicans, serta uji sensitivitasnya dengan antibiotik terkait diameter zona hambat.

2. Definisi operasional variabel utama

Pertama, krim pemutih tanpa izin edar adalah krim pemutih yang didalam kemasannya tidak mencantumkan nomer izin edarnya, yang dibeli di toko kosmetik, pasar tradisional, internet dan tempat penjual makanan burung.

Kedua, antibiotik merupakan suatu senyawa baik alami maupun sintetik yang dapat menghambat atau membunuh mikroba lainnya. Penelitian ini menggunakan antibiotik ampicilin, vankomisin, klindamisin, gentamisin, siprofloksasin, meropenen, piperasilin tazobaktam.

Ketiga, uji mikrobiologis dan identifikasi dalam penelitian ini adalah pengujian ALT, AKK, identifikasi *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*.

Keempat, uji sensitivitas antibiotik adalah pengujian sensitivitas antibiotik dengan metode difusi cakram, yang kemudian hasil diameter zona hambatnya diukur dan dibandingkan dengan tabel CLSI 2017 dan kontrol.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu krim pemutih wajah yang ilegal, tween 80, larutan NaCl 0,9% steril, aquadest, media BHI, media NA, media SDA, media VJA, media PSA, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), kalium telurit, pewarna Gram A (kristal violet), pewarna Gram B (lugol), pewarna Gram C (aseton), pewarna Gram D (safranin), serum kelinci, plasma sitrat, H₂O₂ 3%, standart *Mc Farland*, cakram ampicilin, cakram klindamisin, cakram vankomisin, cakram gentamisin, cakram meropenem, cakram siprofloksasin, dan cakram piperasilin tazobaktam.

2. Alat

Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, peralatan gelas, *vortex*, bunsen, kapas lidi steril, pipet tetes, pipet volum, inkas, inkubator, jarum Ose, *bacterial coloni counter*, dan mikroskop.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan media

Media yang dibuat BHI untuk memperbanyak koloni dan pembuatan suspense bakteri. Media NA untuk pengujian ALT, media SDA untuk pengujian AKK dan *Candida albicans*, media PSA, SIM, LIA, KIA, dan sitrat untuk *Pseudomonas aeruginosa*, media VJA untuk *Staphylococcus aureus* dan media MHA untuk pengujian zona hambat. Cara pembuatan media dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengenceran sampel

Sebanyak 3 gram sampel ditambah dengan 3 ml tween 80 dan dilarutkan hingga 30 ml larutan NaCl 0,9% steril, kemudian dihomogenkan (pengenceran 10^{-1}). Tween 80 bertujuan untuk mempermudah bercampurnya sampel dengan larutan NaCl (Stanley *et al.* 2018). Pengenceran berikutnya diambil 1 ml kemudian ditambah dengan larutan NaCl 0,9% steril sampai 10 ml, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dibuat sampai pengenceran 10^{-3} (BPOM 2011).

3. Pengujian ALT

Diambil 1 ml pada pengenceran 10^{-1} sampel dan di masukan ke dalam cawan petri. Cawan petri diisi dengan media NA 10 ml dan dihomogenkan sampai memadat, setelah itu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pengenceran 10^{-2} , dan 10^{-3} dilakukan serupa (BPOM 2011). Koloni dihitung dengan *bacterial coloni counter*.

4. Pengujian AKK

Diambil 1 ml pada pengenceran 10^{-1} sampel dan di masukan ke dalam cawan petri. Cawan petri diisi dengan media SDA 10 ml dan di amkan sampai memadat, setelah itu dinkubasi selama 3-5 hari dengan suhu 25°C. Pengenceran

10^{-2} , dan 10^{-3} dilakukan serupa (BPOM 2011). Koloni dihitung dengan *bacterial coloni counter*.

5. Identifikasi *Candida albicans*

Pengujian *Candida albicans* dapat menggunakan cawan petri AKK pada pengenceran 10^{-1} , dan setelah itu dilakukan identifikasi. Isolat *Candida albicans* di media SDA berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, warna putih kekuningan dan licin (Radji 2010). Identifikasi lebih lanjut dengan cara sebagai berikut

5.1. Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Prosedur pewarnaan Gram: pertama, koloni sampel yang dicurigai dibuat preparat dan difiksasi. Kedua, ditetesi dengan kristal violet, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Ketiga, ditetesi dengan iodium, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Keempat, preparat didekolorisasi dengan larutan aseton selama 5 detik, dan dibilas air mengalir dan tiriskan. Kelima, ditetesi safranin selama 30 detik kemudian dibilas dan tiriskan. Keenam, dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Jawetz *et al.* 2013; Irianto 2014; Elvira *et al.* 2017). Hasil positif *Candida albicans*. ditunjukkan dengan terdapatnya struktur pseudohifa, blastospora, dan hifa (Jawetz *et al.* 2013; Mutiawati 2016).

5.2. Identifikasi dengan germ tube. Hasil yang diduga *Candida albicans* diambil dengan Ose kemudian dimasukkan kedalam tabung dan ditambah dengan serum kelinci. Inkubasi selama 2 jam dengan suhu 37°C. Ambil 1 Ose kemudian diletakan diatas objek glass dan lihat dengan mikroskop. Hasil positif ditandai dengan adanya *germ tube* yang bentuknya spora berekor (Radji 2010; Jawetz *et al.* 2013; Jan *et al.* 2018).

5.3. Kontrol. Perlakuan yang serupa dilakukan pada *Candida albicans* untuk memastikan hasil isolat yang didapat benar. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan *Candida albicans* ATCC 10231 pada media SDA, kemudian identifikasi dengan pewarnaan Gram untuk melihat struktur, dan uji dengan serum untuk melihat *germ tube*.

6. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Pengujian *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan mengambil 1 ml pada pengenceran 10^{-1} , kemudian dimasukan ke dalam cawan petri dan ditambah media PSA dibiarkan sampai memadat. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Dikatakan positif jika koloni berwarna hijau kebiru-biruan (Jawetz *et al.* 2012).

6.1. Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Prosedur pewarnaan Gram: pertama, koloni bakteri yang telah dibuat preparat difiksasi. Kedua, ditetesi dengan kristal violet, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Ketiga, ditetesi dengan iodium, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Keempat, preparat didekolorisasi dengan larutan aseton selama 5 detik, dan dibilas air mengalir dan tiriskan. Kelima, ditetesi safranin selama 30 detik kemudian dibilas dan tiriskan. Keenam, dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Jawetz *et al.* 2013; Irianto 2014; Elvira *et al.* 2017). Hasil positif *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan dengan bentuk batang dan warna merah (Jawetz *et al.* 2013).

6.2. Pengujian biokimia. Koloni bakteri pada media PSA diinokulasikan ke media KIA, LIA dan Sitrat dengan cara ditusuk gores, sedangkan SIM dengan cara ditusuk menggunakan jarum ent, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Sulviana *et al.* 2017). Hasil positif pada media SIM ditandai tidak adanya warna hitam (sulfida) dan indol yang telah ditetesi erlich A dan B, serta adanya penyebaran kekeruhan (motilitas). Hasil positif pada media KIA ditandai adanya warna merah pada lereng dan dasar serta tidak adanya warna hitam ($\text{K/K}^{\text{S-}}$), pada media LIA warna lereng dan dasar ungu serta tidak adanya warna hitam ($\text{K/K}^{\text{S-}}$), sedangkan pada media Sitrat ada perubahan warna hijau menjadi biru (Sulviana *et al.* 2017).

6.3. Kontrol. Perlakuan yang serupa dilakukan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* untuk memastikan hasil isolat yang didapat benar. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media PSA, kemudian bakteri diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, uji biokimia dengan SIM, LIA, KIA, dan sitrat.

7. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Pengujian *Staphylococcus aureus* dengan cara diambil 1 ml pada pengenceran 10^{-1} , kemudian dimasukkan kedalam cawan petri, dan dituangi media VJA yang telah ditambah kalium telurit sebagai pemberi pigmen hitam dan untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain yang tumbuh. Inkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C , hasil positif *Staphylococcus aureus* dengan koloni hitam dan zona sekeliling kuning. Pemastian dilakukan uji pewarnaan Gram, katalase, dan koagulase (Radji 2010).

7.1. Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Prosedur pewarnaan Gram: pertama, koloni bakteri yang telah dibuat preparat difiksasi. Kedua, ditetesi dengan kristal violet, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Ketiga, ditetesi dengan iodium, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditiriskan. Keempat, preparat didekolorisasi dengan larutan aseton selama 5 detik, dan dibilas air mengalir dan tiriskan. Kelima, ditetesi safranin selama 30 detik kemudian dibilas dan tiriskan. Keenam, dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Jawetz *et al.* 2013; Irianto 2014; Elvira *et al.* 2017). Hasil positif *Staphylococcus sp.* ditunjukan dengan bentuk bulat bergerombol dan warna ungu atau merah ungu seperti anggur (Jawetz *et al.* 2013).

7.2. Identifikasi dengan uji katalase. Larutan H_2O_2 3% ditetaskan 1 tetes di atas objek glass kemudian ambil 1 ose koloni bakteri dari media VJA, lalu amati adanya gelembung gas yang menunjukkan hasil positif (Elvira *et al.* 2017).

7.3. Identifikasi dengan uji koagulase. Plasma sitrat kelinci 1 tetes diatas objek *glass* kemudian tambahkan 1 tetes suspensi bakteri atau 1 koloni bakteri lalu diamati secara mikroskop dengan melihat ada atau tidaknya penggumpalan yang menunjukkan hasil positif. Uji dengan media tabung dengan menambahkan serum plasma 1 ml dan 1 ml suspensi bakteri, akan terjadi endapan atau penggumpalan (Jawetz *et al.* 2013 & Elvira *et al.* 2017).

7.4. Kontrol. Perlakuan yang serupa dilakukan pada bakteri *Staphylococcus aureus* untuk memastikan hasil isolat yang didapat benar. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan bakteri *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 pada media VJA, kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, katalase dan koagulase.

8. Uji sensitivitas antibiotik

8.1. Pembuatan suspensi bakteri. Isolat bakteri yang positif dari media VJA atau PSA diinokulasikan pada media cair BHI, kemudian diinkubasi selama 1-2 jam dengan suhu 37°C. Kekeruhan yang terjadi pada media BHI dibandingkan dengan standart *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) (Elvira *et al.* 2017).

8.2. Uji sensitivitas difusi dengan cakram. Pengujian dilakukan dengan medium MHA yang telah dicairkan dituang ke dalam cawan petri steril dan ditunggu memadat. Kedua, kapas lidi steril dimasukkan dalam medium BHI yang mengandung biakan kemudian goreskan ke MHA dengan metode perataan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar agar suspensi bakteri terdifusi ke dalam media. Ketiga, cakram antibiotik diletakkan pada medium MHA dengan jarak yang sama. Cakram antibiotik yang digunakan untuk *Staphylococcus aureus* yaitu ampicilin 10 µg, klindamisin 2 µg, vankomisin 30 µg, dan gentamisin 10 µg, sedangkan untuk *Pseudomonas aureginosa* menggunakan cakram gentamisin 10 µg, piperasilin tazobaktam 100/10 µg, siprofloksasin 5 µg, dan meropenem 5 µg. Keempat, medium MHA diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, dilakukan replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Ukur diameter zona bening yang terbentuk sekitar cakram. Zona bening yang didapat dibandingkan dengan tabel CLSI 2017. (Elvira *et al.* 2017). Perlakuan yang serupa dilakukan pada kontrol bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aureginosa*.

8.3. Range diameter zona hambat antibiotik Sensitivitas suatu antibiotik dapat dibandingkan dengan tabel Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tahun 2017. Range diameter zona hambat antibiotik dapat dilihat pada tabel 1.

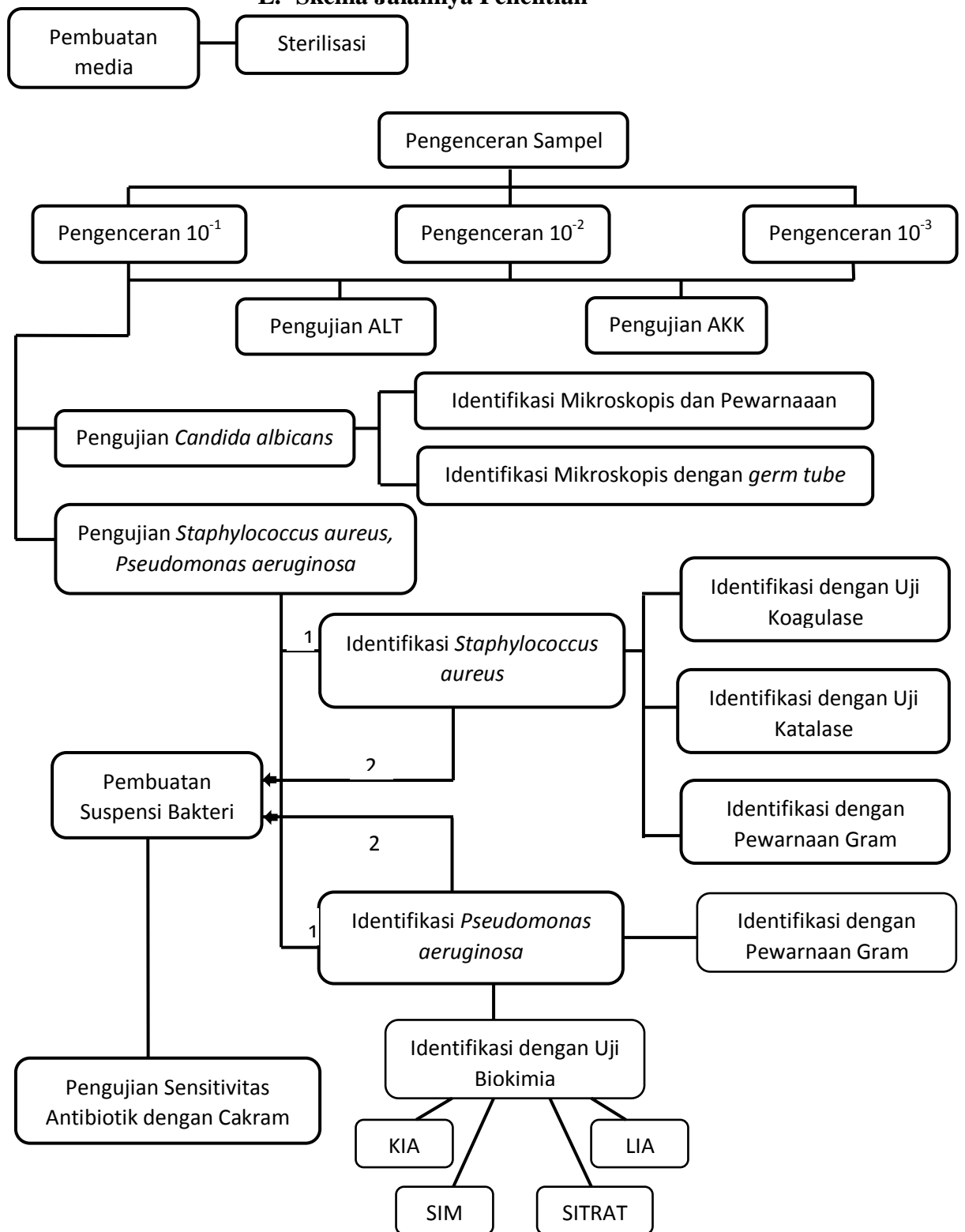
Tabel 1. Diameter Zona Hambat

Antibiotik	Kandungan Disk	Kategori Diameter Zona Hambat (mm)	
		<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

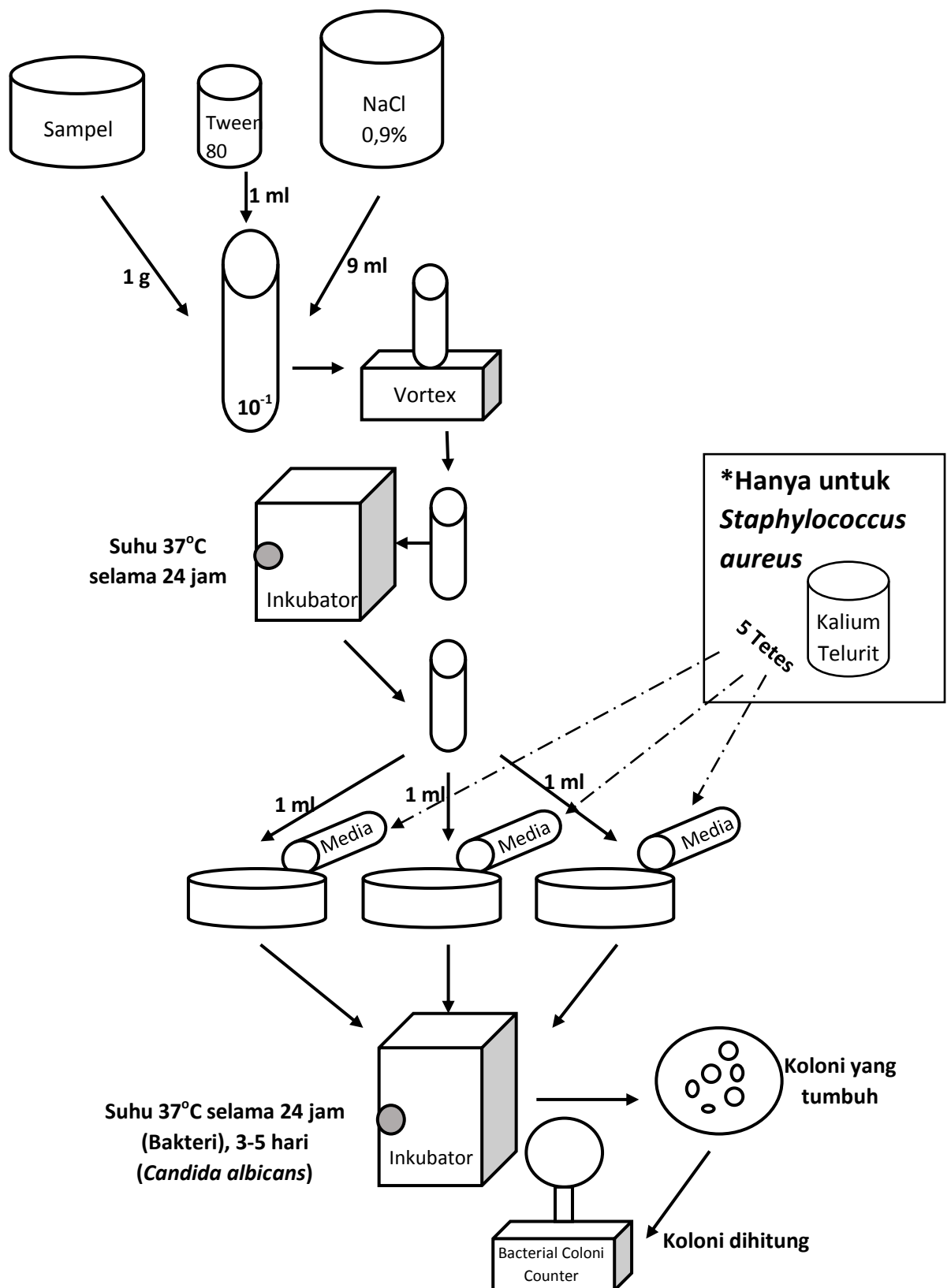
		S	I	R	S	I	R
Ampisilin	10 µg	27-35	-	-	-	-	-
Klindamisin	2 µg	>20	15-20	<15	-	-	-
Vankomisin	30 µg	17-21	-	-	-	-	-
Gentamisin	10 µg	>14	13-14	<13	>14	13-14	<13
Piperasilin-tazobactam	100/10 µg	-	-	-	>20	15-20	<15
Siprofloksasin	5 µg	>20	16-20	<16	>20	16-20	<16
Meropenem	10 µg	29-37	-	-	>18	16-18	<16

S: sensitif, I: intermediet, R: resiten

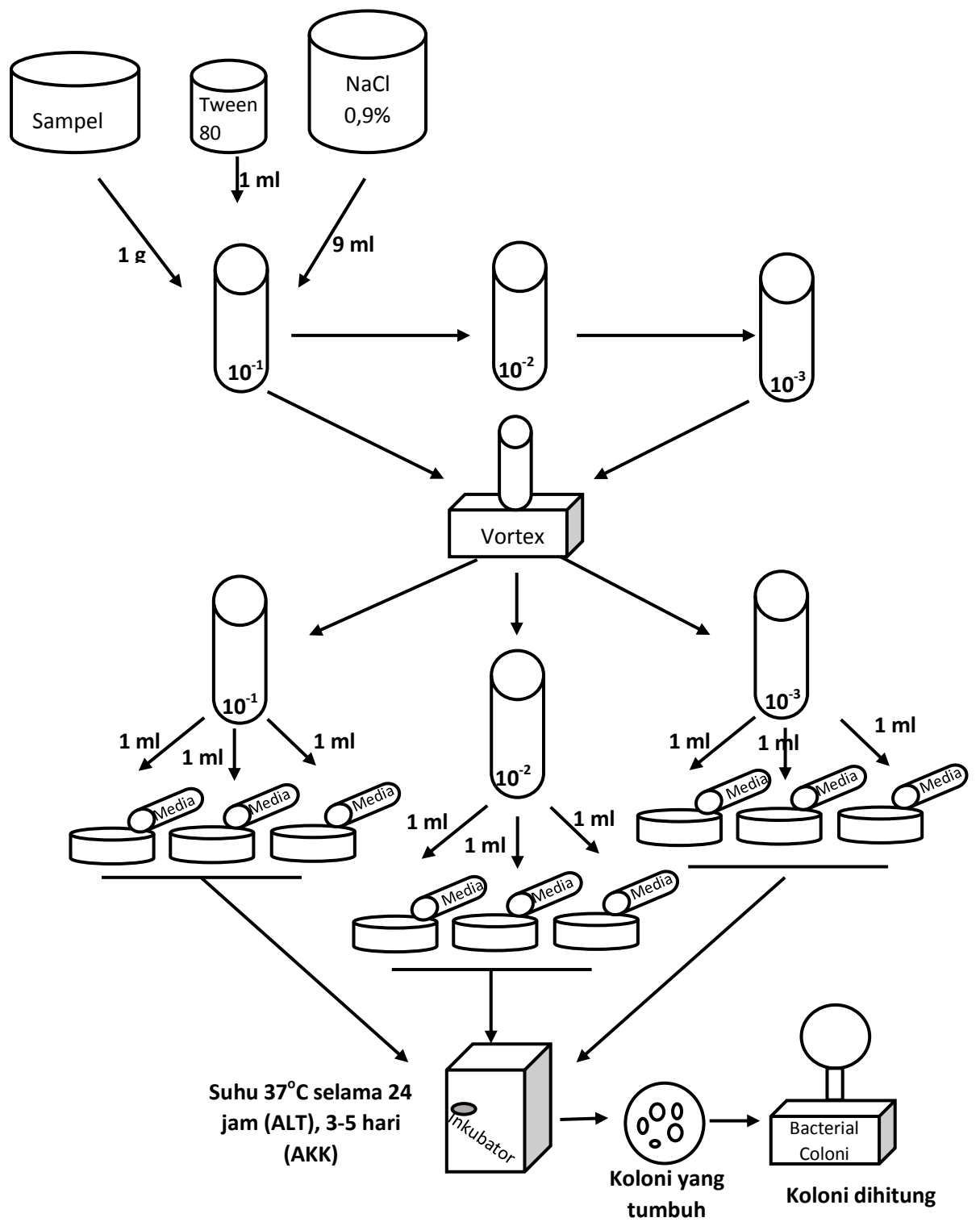
E. Skema Jalannya Penelitian



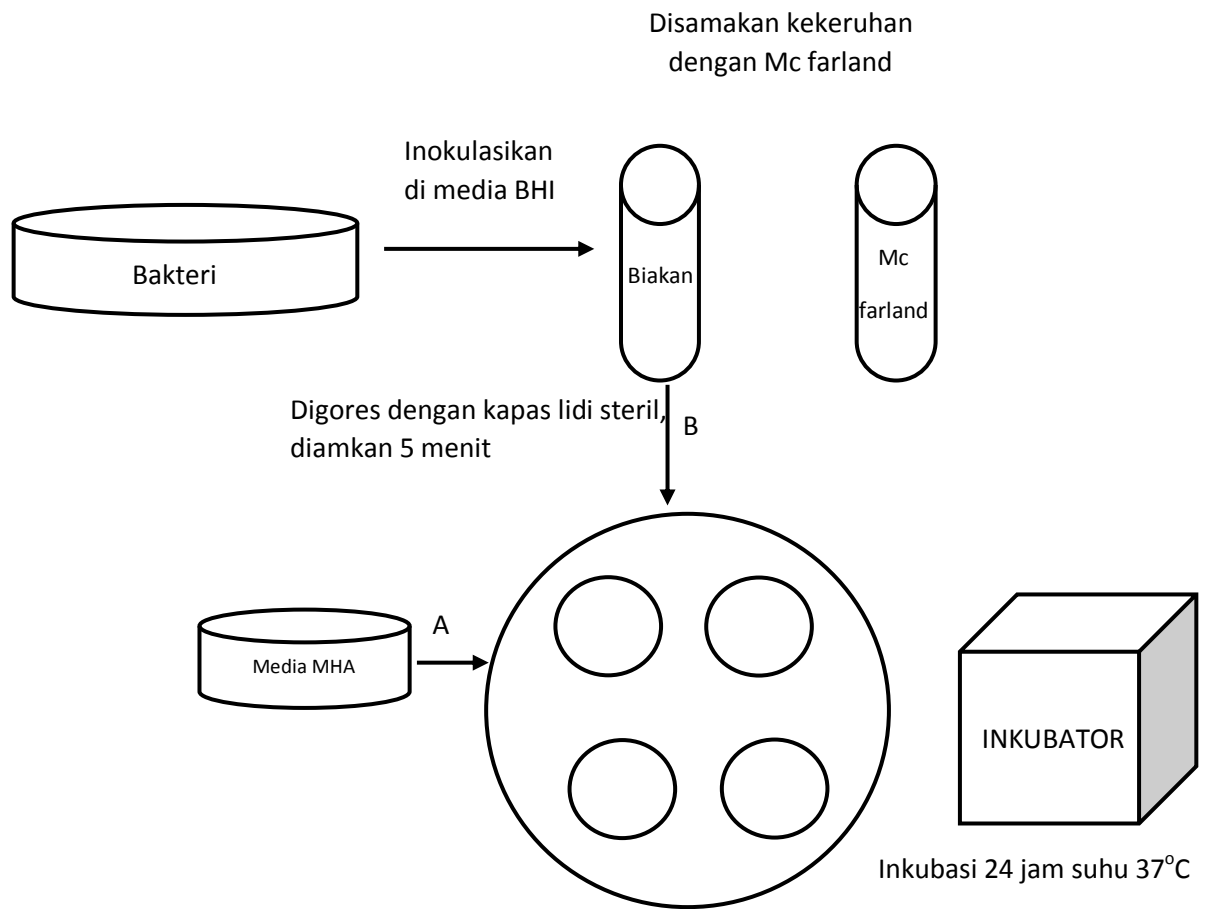
Gambar 1 Skema jalannya penelitian



Gambar 2. Skema pengerjaan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *Candida albicans*



Gambar 3. Skema pengerjaan ALT dan AKK



Gambar 4. Skema pengerjaan uji sensitivitas