

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah 5 sediaan tetes mata (A kemasan 7,5 mL, B kemasan 7 mL, C kemasan 6 mL, D kemasan 5 mL, dan E kemasan 13 mL) mengandung tetrahidrozolin HCl yang dijual bebas di Apotek daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah.

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

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 sediaan tetes mata mengandung Tetrahidrozolin HCl yang diambil secara acak dengan memilih sediaan yang tidak kadaluarsa yang diperoleh pada bulan Desember 2018 dari daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah 5 sediaan tetes mata yang diambil secara acak dengan memilih sediaan yang tidak kadaluarsa dan masih layak pakai, identifikasi cemaran dengan uji kekeruhan tabung terhadap 5 sediaan tetes mata setelah pemakaian dan penyimpanan.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

**2.1. Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu setelah pemakaian dan suhu penyimpanan.

**2.2. Variabel terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara

tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril) dan waktu pengamatan.

**2.3. Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah sterilitas sediaan tetes mata yang dipengaruhi oleh lama waktu penyimpanan dan suhu yang berbeda.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, sediaan tetes mata adalah sediaan steril larutan atau suspensi, digunakan untuk mata dengan cara meneteskan obat pada selaput lendir mata disekitar kelopak mata dan bola mata.

Kedua, 5 sediaan tetes mata yang dibeli di Apotek daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah.

Ketiga, 5 sediaan tetes mata yang belum memasuki masa kadaluarsa dengan tujuan kerja zat aktif maupun zat tambahan masih berkerja dengan baik.

Keempat, sediaan tetes mata di simpan pada suhu yang berbeda yaitu di suhu kamar dan suhu dingin dimaksudkan untuk melihat stabilitas daya hambat antibakteri dari zat aktif maupun zat tambahan.

Kelima, Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba.

Keenam, uji fertilitas suatu pengujian untuk memastikan bahwa yang media yang digunakan selama pengujian dapat menumbuhkan mikroba.

Ketujuh, uji sterilitas adalah uji untuk mengetahui steril atau tidaknya sediaan dari cemaran mikroba.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer 500 ml), gelas beker 600 ml, gelas beker 100 ml, corong kaca, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 100 ml, tabung reaksi, bunsen, mortal, *spreader*, pipet volume 1 ml,

propipet, autoklaf, inkubator, timbangan analit, rak tabung reaksi, *thermometer*, LAF), dan *colony counter*.

## 2. Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan tetes mata yang dibeli di apotik daerah Surakarta, media *Brain Heart Infusion*, media *Saboraud Glucose Agar*, media *Thioglycollate*, aquadest, aquadest steril.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan berdasarkan metode sampling *non* probabilitas dengan menggunakan metode konvein yang didasarkan pada kemudahan akses yang dimiliki oleh peneliti. Dalam hal ini sampel yang memiliki kriteria adalah sampel tetes mata steril tidak kadaluarsa yang dijual di apotik daerah Surakarta.

### 2. Perlakuan sampel dan penyimpanan

Sampel yang telah didapatkan dan dibagi 2 yaitu ada yang disimpan di suhu ruang 27 - 30°C dan juga ada yang disimpan pada suhu dingin 8°C, selanjutnya tutupnya dibuka sesuai perlakuan yaitu dengan meneteskan satu kali sehari dua tetes sediaan dan ditutup kembali selama penyimpanan.

### 3. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, corong, dan pipet ditutup mulutnya dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas. kemudian semua alat disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan uapnya mencapai 2 – 4 atm. Lemari aseptis dibersihkan dengan menggunakan alkohol.

### 4. Pembuatan media BHI (*Brain Heart Infusion*)

Ditimbang *Brain Heart Infusion Agarpowder* 3,70 g, Glukosa 0,05 g, *Selebiosa* (CMC) 0,05 g, *Starch* 0,05 g, *Cystein* 0,05 g, *Hemin* (0,05%) 0,5 ml, *Resazurin* 0,05 ml, *Aquadest* secukupnya. Cara pembuatan semua bahan dimasukkan kecuali *cystein* ke dalam botol *Scotch*, kemudian ditambahkan

aquades sampai volume 100 ml. Larutan tersebut dimasak sampai mendidih dan didinginkan sambil dialirkan gas CO<sub>2</sub>, setelah larutan dingin, *cystein* dimasukkan. Larutan dicek pH 4 dan pH 7 sampai media pH 7, kemudian dialiri gas CO<sub>2</sub> hingga berubah warna dari merah menjadi kuning.

### 5. Pembuatan media SGA (*saboraud glukosa agar*)

Ditimbang media *saboraud glukosa agar* sebanyak yang diperlukan dalam Erlenmeyer. Lalu ditambahkan aquadestillata sebanyak 50 ml dan aduk hingga homogen. Erlenmeyer yang berisi larutan tadi dipanaskan diatas api sambil diaduk - aduk hingga mendidih. Kemudian erlenmeyer diangkat, mulut erlenmeyer ditutup dan di bungkus dengan koran serta diangkat dengan tali. Lalu erlenmeyer dimasukkan dalam autoclaf untuk sterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan uapnya mencapai 2 – 4 atm. Setelah media steril dimasukkan dalam botol injeksi. Botol injeksi yang berisi media dimiringkan agar *slunt but*, ditunggu media keras. Media yang lebih dimasukkan dalam *petridish*.

### 6. Pembuatan media *Thioglycolate*

Ditimbang 5,95 g serbuk *Thioglycolate* medium USP, kemudian larutkan dalam 200 ml aquadestillata mendidih, aduk hingga larut dan homogen. Dimasukkan dalam tabung reaksi dimana volum pengisian kurang lebih 2 ml media *Thioglycolate*, kemudian tabung ditutup/disumbat dengan kapas. Sterilisasi dengan autoclaf 121°C selama 15 menit dan tekanan uapnya mencapai 2 – 4 atm.

### 7. Uji fertilitas dan sterilitas media

Uji fertilitas media merupakan suatu pengujian untuk memastikan bahwa media yang digunakan selama pengujian dapat menumbuhkan mikroba. Media yang digunakan untuk uji fertilitas yaitu media *Brain Heart Infusion*, *Saboraud Glucose Agar*, dan *Thioglycollat* dengan cara menginokulasi triplo pada wadah tiap media secara terpisah dengan dua bakteri dan satu jamur, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Media uji memenuhi syarat jika terjadi pertumbuhan yang nyata dalam semua wadah media yang diinokulasi dalam kurung waktu 24 – 48 jam.

Uji sterilitas media merupakan suatu pengujian untuk membunuh semua jasad renik yang ada, sehingga jika ditumbuhkan di dalam suatu media tidak ada lagi jasad renik yang dapat berkembang biak. Media yang digunakan untuk uji

sterilitas yaitu media *Brain Heart Infusion*, *Saboraud Glucose Agar*, dan *Thioglycollat* dengan cara menginokulasikan secara langsung kedalam media uji. Uji sterilitas dinyatakan tidak apsah jika media uji menunjukan respon pertumbuhan yang tidak memadai. Media uji memenuhi syarat jika terjadi pertumbuhan yang nyata dalam semua wadah media yang diinokulasi dalam kurung waktu 24 – 48 jam.

#### **8. Pengambilan sampel sediaan untuk uji sterilitas**

Preparasi uji sterilitas dilakukan didalam ruang steril (dibawah *laminar air flow* yang telah disiapkan atau dalam enkas yang sudah dibersihkan dengan alcohol 70% dan diuapi dengan formalin).

Uji dengan media *Thioglicolate* yaitu siapkan 12 tabung reaksi yang berisi media *Thioglycolate* yang sudah disterilkan dan beri nomor. Penjelasan tabung reaksi :

Tabung 1 : kontrol sterilitas media ( yang berisi hanya media *Thioglycolate* ).

Tabung 2 : kontrol sterilitas ruang ( inkas ) yang berisi media *Thioglycolate*, tabung dibuka selama proses persiapan sampel uji sterilitas, seetelah selesai maka tabung ditutup kembali.

Tabung 3 - 7 : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu kamar minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Tabung 8 - 12 : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu dingin minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

diinkubasi dan dicatat hasil uji sterilisasi nya sampai dengan 7 hari sampel yang diambil adalah sampel pada minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Uji dengan media *Brain Heart Infusion* yaitu siapkan 12 tabung reaksi yang berisi media *Brain Heart Infusion* yang sudah disterilkan dan beri nomor. Penjelasan tabung reaksi :

Tabung 1 : kontrol sterilitas media (yang berisi hanya media *Brain Heart Infusion*).

Tabung 2 : kontrol sterilitas ruang (enkas) yang berisi media *Brain Heart Infusion*, tabung dibuka selama proses persiapan sampel uji sterilitas, seetelah selesai maka tabung ditutup kembali.

Tabung 3 - 7 : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu kamar minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Tabung 8 -12 : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu dingin minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Diinkubasi dan dicatat hasil uji sterilisasi nya sampai dengan 7 hari sampel yang diambil adalah sampel pada minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Uji dengan media *saboraud glukosa agar* yaitu siapkan 12 petridish yang berisi medium *saboraud glukosa agar* yang sudah disterilkan dan beri nomor. Penjelasan tabung reaksi :

*Petridish 1* : kontrol sterilitas media (yang berisi hanya media *Saboraud Glukosa Agar*).

*Petridish 2* : kontrol sterilitas ruang (enkas) yang berisi media *Saboraud Glukosa Agar*, tabung dibuka selama proses persiapan sampel uji sterilitas, seetelah selesai maka tabung ditutup kembali.

*Petridish 3 - 7* : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu kamar minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

*Petridish 8 - 12* : berisi 5 sampel sediaan tetes mata yang disimpan pada suhu dingin minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Diinkubasi dan dicatat hasil uji sterilisasi nya sampai dengan 7 hari sampel yang diambil adalah sampel pada minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

## 9. Uji sterilitas sediaan

Siapkan sampel, media dan peralatan yang steril dalam inkas yang steril. Pada uji kekeruhan tabung pada media *Thyoglicolate* ambil sampel dari masing-masing sampel pada suhu kamar dan suhu dingin minggu pertama menggunakan pipet steril sebanyak 2 ml, masukan dalam tabung reaksi yang sudah berisi media *thyoglicolate* dimana penggerjaan dekat dengan lampu bunsen, lalu tutup tabung

reaksi dengan kapas, kemudian inkubasi selama 1 minggu pengamatan dilakukan setiap hari sehingga tercatat awal mulai terjadinya kekeruhan. Lakukan juga pada sampel minggu kedua, ketiga, keempat dan kelima.

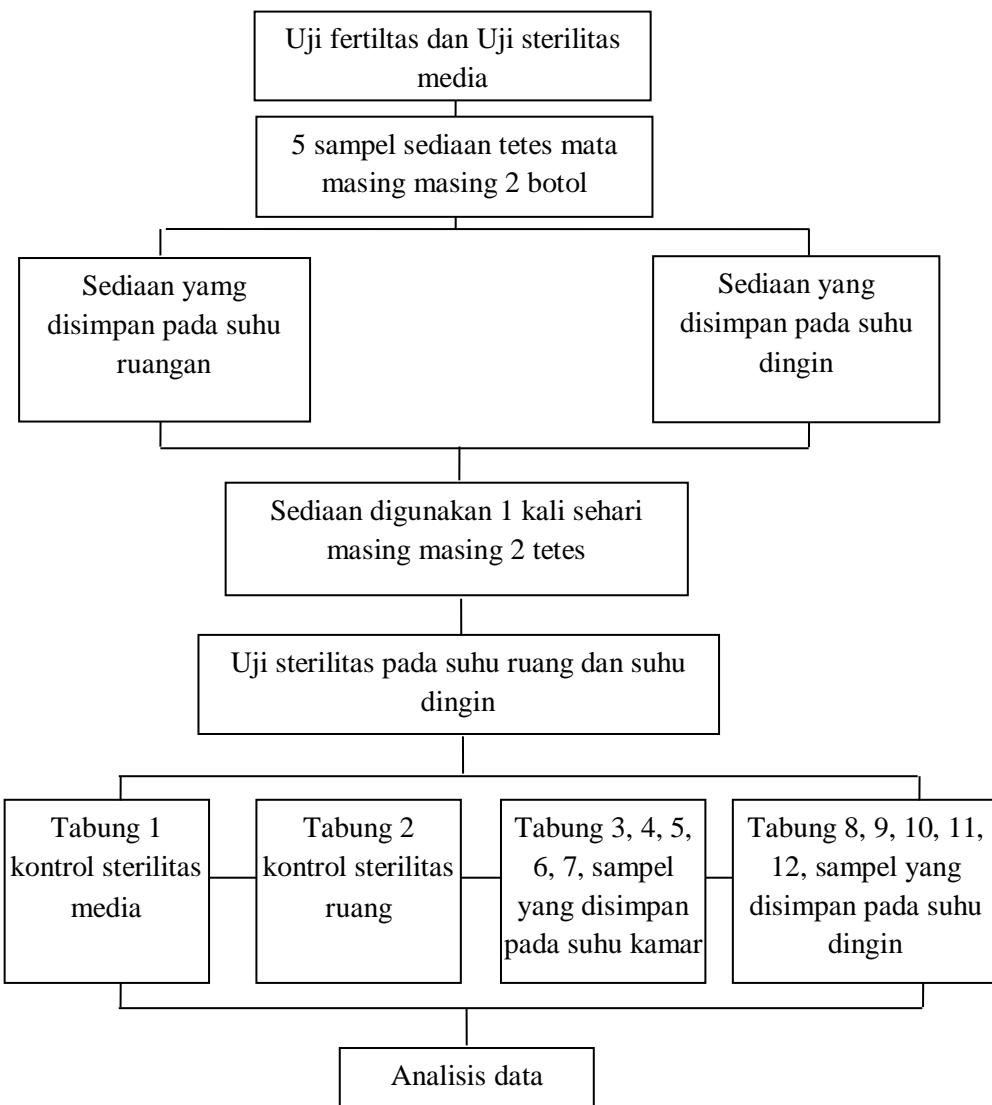
Pada uji kekeruhan tabung pada media *Brain Heart Infusion* ambil sampel dari masing-masing sampel pada suhu kamar dan suhu dingin minggu pertama menggunakan pipet steril sebanyak 1 ml, masukan dalam tabung reaksi yang sudah berisi media *Brain Heart Infusion* dimana pengerajan dekat dengan lampu bunsen, lalu tutup tabung reaksi dengan kapas, kemudian inkubasi selama 1 minggu pengamatan dilakukan setiap hari sehingga tercatat awal mulai terjadinya kekeruhan. Lakukan juga pada sampel minggu kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Pada uji pertumbuhan koloni pada media *Saboraud Glukosa Agar* ambil sampel dari masing-masing sampel pada suhu kamar dan suhu dingin minggu pertama menggunakan jarum ose steril yang telah dipanaskan, oleskan pada media media *Saboraud Glukosa Agar* dalam *Petridish* dimana pengerajan dekat dengan lampu bunsen, lalu tutup *Petridish* dengan aseptis, kemudian inkubasi selama 1 minggu dimana pengamatan dilakukan setiap hari sehingga tercatat awal mulai terjadinya pertumbuhan koloni. Lakukan juga pada sampel minggu kedua, ketiga, keempat dan kelima.

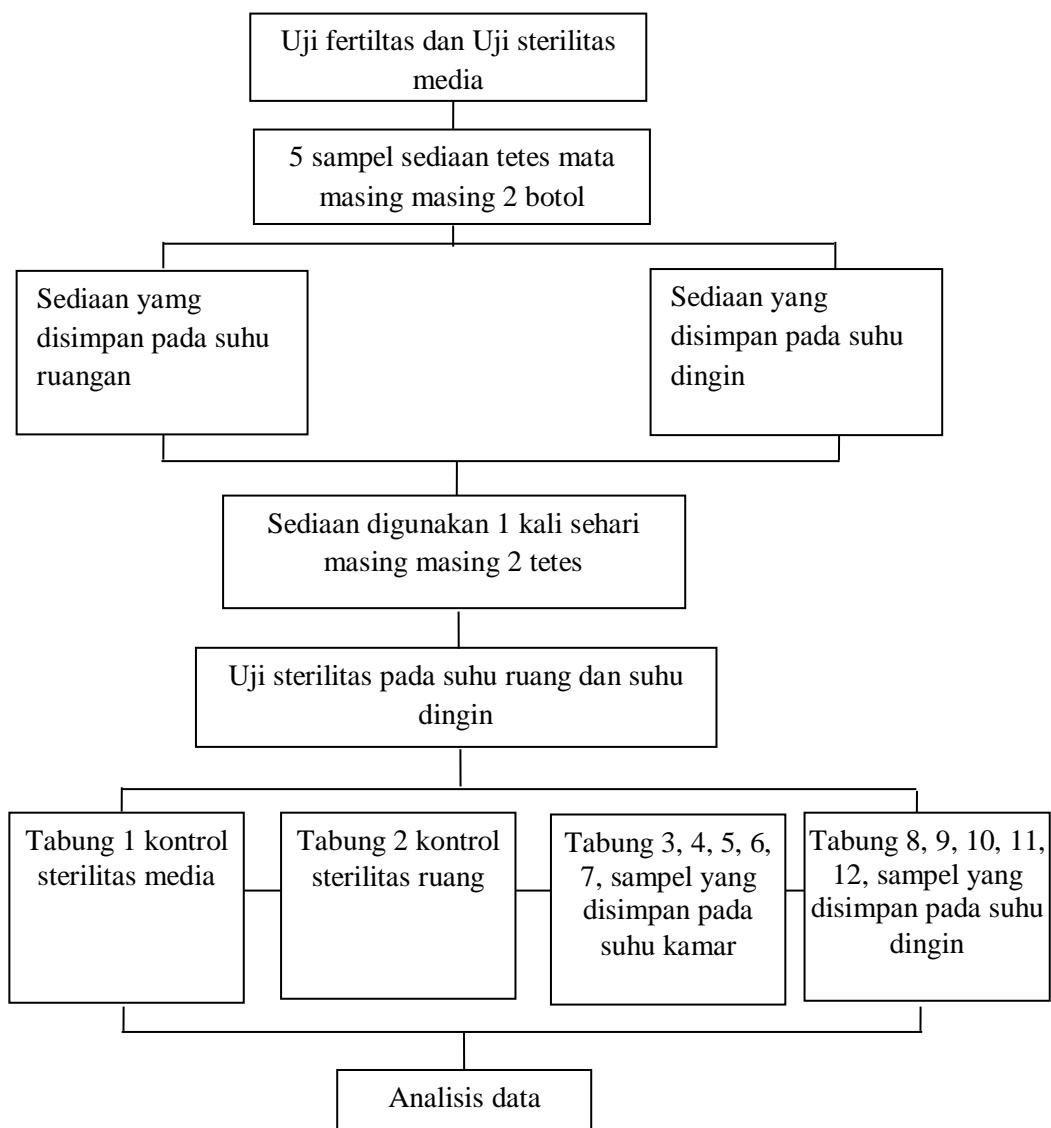
#### **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari analisis laboratorium dipaparkan secara deskriptif. Hasil Uji Sterilitas terhadap kultur sediaan ditabulasi dan dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif atau standar identifikasi menurut kunci standart farmakope edisi V bahwa sediaan tetes mata adalah sediaan steril tanpa kontaminasi.

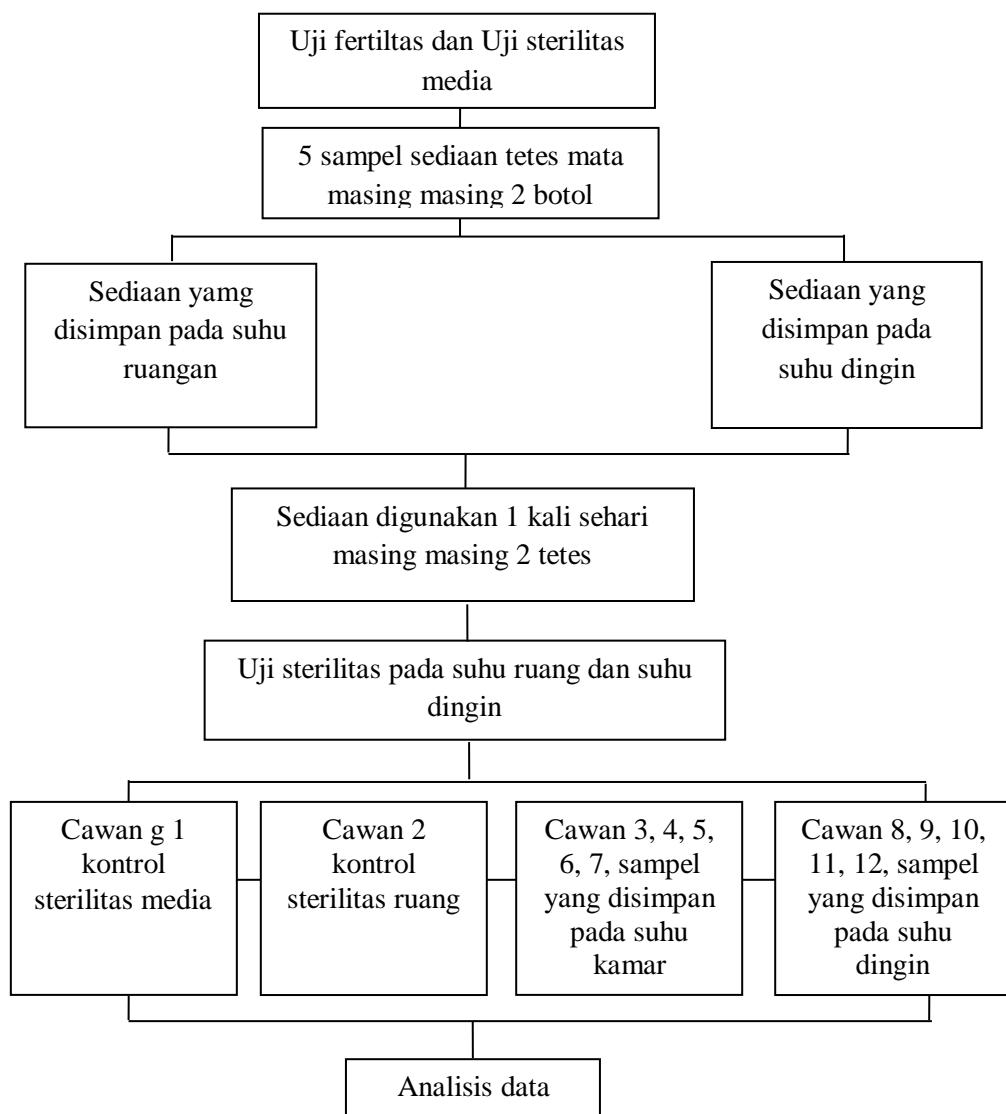
### F. Skema Penelitian



**Gambar 2. Skema penelitian media *thioglycolate***



**Gambar 3. Skema penelitian media *Brain Heart Infusion***



**Gambar 4. Skema penelitian media *sabouraud glukosa agar***