

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis eksperimental laboratorium, Produk sediaan *lotion* probiotik yang beredar dimasyarakat dibeli secara online kemudian di uji viabilitas untuk mengetahui keberadaan bakteri asam laktat dan kandungan asam laktat pada produk tersebut.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari – Juni 2024 bertempat di Laboratorium Farmasetika Teknologi Farmasi dan Microbiologi Universitas Bhakti Kencana Bandung, Jalan Soekarno Hatta No 754, Bandung.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini menggunakan sediaan *lotion* probiotik yang beredar di pasaran yang diklaim oleh masyarakat mengandung bakteri probiotik asam laktat dan kandungan asam laktat. Sampel yang digunakan dalam penelitian menggunakan beberapa sediaan *lotion* probiotik yang beredar di pasaran dan dapat dibeli secara online. Penentuan besar sampel membeli secara acak 5 merk yang berbeda.

3.4 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Pengujian ini dilakukan 6 tahapan, pengujian pertama uji viabilitas BAL selama 7 hari berturut-turut pada sediaan *lotion* probiotik untuk melihat ketahanan hidup bakteri, kemudian melakukan perhitungan dengan metode angka lempeng total (ALT). Dalam pengujian ini bertujuan untuk memudahkan perhitungan pada isolat bakteri asam laktat. Pengujian kedua melakukan pemeriksaan bakteri secara mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya, dalam hal ini keberadaan sel bakteri asam laktat dapat diidentifikasi dengan menggunakan teknik pewarnaan sederhana. Setelah bakteri diidentifikasi dan mengumpulkan jumlah koloninya, kemudian melakukan uji makroskopis dengan melihat langsung hasil isolasi bakteri. Pengujian selanjutnya di uji pengukuran pH. Dan pengujian

terakhir di uji kadar asam total menggunakan uji titrasi (asam basa), pengujian ini bertujuan untuk melihat kandungan asam laktat pada sediaan *lotion* probiotik.

3.5 Analisis Data

Analisis data penelitian ini menggunakan standar deviasi. Standar deviasi atau simpangan baku merupakan suatu nilai yang menunjukkan tingkat atau derajat variasi kelompok atau ukuran standar penyimpangan dari reratanya (Febriani 2022).

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spatula logam, timbangan analitik, hot plate, autoklaf, cawan porselin, gelas ukur, cawan petri, rak tabung, tabung reaksi, vortex, mikropipet 1000 μ L, *L-Rod*, *colony counter*, inkubator, kaca objek, pinset, bunsen, mikroskop cahaya, jarum ose gores, Erlenmeyer, buret, statif, klem, corong, pipet tetes.

3.6.2 Bahan

Bahan yg digunakan yaitu *skin care* sediaan *lotion* probiotik 5 merk berbeda, masker, sarung tangan, media MRS (*De man rogosa and sharpe*), NaCl 0,85%, alkohol 70%, kertas label, aquadest, *methilen blue*, tisu, larutan NaOH 0,01N, indikator phenolphthalein (PP) 0,5%.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Viabilitas dan Angka Lempeng Total (ALT) BAL

Uji viabilitas dan angka lempeng total (ALT) dilakukan pada isolat mikroba sediaan *lotion* probiotik yang di inkubasi selama 48 jam. Pengujian ini dilakukan didalam ruangan laminar air flow, Pengerjaan pada isolat mikroba dilakukan menggunakan teknik *spread plate method* (sebaran).

1. Langkah awal sterilisasikan alat dan media MRSA yang akan digunakan menggunakan autoklaf.
2. kemudian sebanyak 1 ml sampel diencerkan 10^{-6} menggunakan NaCL 0,85% lalu vortek.

Pembuatan NaCl 0,85% yaitu serbuk NaCl ditimbang sebanyak 0,85 gram, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer. Ditambahkan 100 ml aquades, lalu aduk hingga homogen dan panaskan sampai mendidih. Diangkat erlenmeyer lalu dibungkus dengan kertas dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. kemudian tuangkan media agar cair MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar*) kedalam cawan petri dengan suhu 44-46°C sebanyak 15-20 ml untuk setiap cawan petri.
4. Media agar pada cawan petri didiamkan maksimum 15 menit sebelum penuangan sampel ke dalam cawan petri. Kemudian masukan sampel 1 mL ke dalam cawan petri menggunakan mikropipet 1000µl.
5. Media dicampur merata dengan menggunakan *L-Rod*.
6. Setelah media agar memadat, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dan diletakkan dalam posisi terbalik. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 Jam.
7. Jumlah koloni yang diperoleh dihitung menggunakan *colony counter* yang dinyatakan dengan *Colony Forming Unit* (CFU). Pengujian metode ini dilakukan triplo dan control negatif setiap pengerjaan.
8. Jumlah koloni bakteri dari sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$CFU/mL = \sum \frac{\text{Koloni percawan}}{\text{Volume yang ditanam (mL)}} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Keterangan:

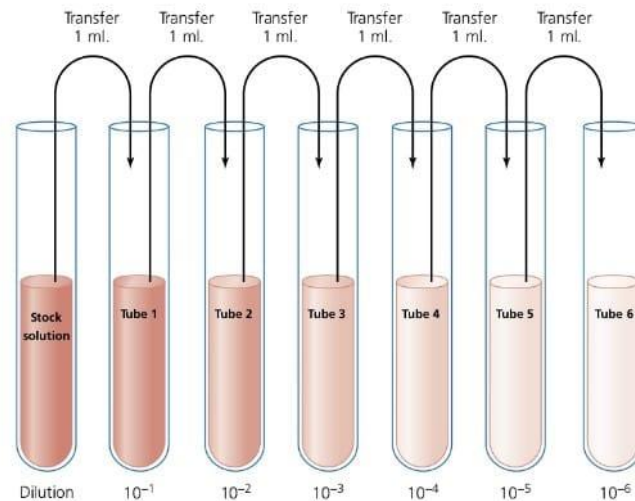
Koloni Percawan: Jumlah Koloni yang terhitung pada cawan petri.

Volume yang ditanam: volume larutan yang ditanam pada media (mL).

Faktor Pengenceran: Faktor pengenceran sampel.

(Modifikasi Hanum *et al.*, 2016).

Setelah mengetahui ketahanan dan jumlah koloni bakteri asam laktat, kemudian dilakukan pemeriksaan jumlah bakteri tersebut memenuhi persyaratan atau tidak. Syarat bakteri yang baik pada kulit untuk sediaan topikal menunjukkan bahwa kulit yang normal ditempati oleh bakteri sekitar 10^2 hingga 10^6 CFU/mL.



Gambar 7. Pengenceran Serial (*Sumber: Cappucino, J. G., & Welsh, C. 2018*)

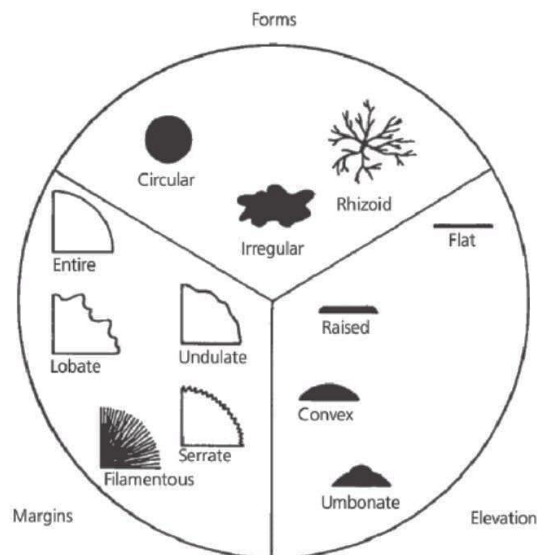
3.7.2 Uji Pemeriksaan Bakteri Secara Mikroskopis Dan Makroskopis

a. Mikroskopis

Pewarnaan sederhana dapat dilakukan dengan mengambil hasil isolasi bakteri sebelumnya 10^{-1} menggunakan jarum inokulasi yang disebar dan dibiarkan beberapa saat. Jarum inokulasi distrelisasi terlebih dahulu dengan cara dipijarkan di api Bunsen. Kemudian dilakukan fiksasi pada kaca objek dan diberi zat pewarna *methilen blue*, lalu dicuci menggunakan aquadest dan dikeringkan untuk dapat diamati di pengamatan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x (Fatma Azizah *et al.*, 2016).

b. Makroskopis

Identifikasi pada makroskopis dilakukan dengan melihat langsung isolat koloni yang tumbuh dicawan petri yang telah di isolasi selama 48 jam. pengamatan meliputi warna, bentuk, tepi, permukaan serta sudut elevasi yang terbentuk pada isolat (Kurnia *et al.*, 2020).



Gambar 8. Karakteristik Bakteri (*Sumber: Cappucino, J. G., & Welsh, C. 2018*)

3.7.3 Uji pH Sediaan *Lotion* Probiotik

Pengukuran nilai pH pada sampel sediaan *lotion* probiotik menggunakan pH meter yang dikalibrasi dan harus distandardisasi dengan larutan buffer pH 4, 5 dan 9 sebelum digunakan. Setelah dikalibrasi kemudian elektroda dibilas dengan air aquades. Elektroda dikeringkan dengan kertas tisu lalu dicelupkan kedalam sampel. Kemudian elektroda dibiarkan beberapa saat. Nilai pH yang dibaca adalah saat pH meter dalam keadaan stabil (Silaban *et al.*, 2020).

3.7.4 Uji Kadar Asam Total

Metode titrasi (asam basa) digunakan dalam proses analisis untuk menentukan kadar asam laktat. Langkah pertama 10 ml larutan dari hasil angka lempeng total (ALT) diambil dalam erlenmayer, kemudian tambahkan dengan tiga tetes indikator fenolftalein 0,5% (PP). lalu campuran tersebut dititrasi dengan larutan NaOH 0,01N hingga *Total Acid Titration (TAT)* atau warna berubah menjadi merah muda (Modifikasi Purnavita *et al.*, 2014).