

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini mengamati pengaruh pencampuran gondorukem dan hidrosol minyak daun jeruk purut pada pembuatan pembersih lantai sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Teknik Bioproses Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UB.

3.1. Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan serta fungsinya ditunjukkan pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Alat penelitian dan kegunaan.

Alat Penelitian	Kegunaan
<i>Hot plate</i>	Pemanasan sampel
Inkubator	Memberikan kondisi pertumbuhan yang optimum bagi <i>Staphylococcus aureus</i>
Tabung reaksi	Media pertumbuhan bagi <i>Staphylococcus aureus</i> untuk peremajaan
Cawan petri	Media pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> untuk uji antimikroba
Autoklaf	Sterilisasi media nutrient agar
Peralatan kaca	Persiapan media penelitian
Mortar and Pestle	Menghaluskan gondorukem
Jarum ose	Menginokulasikan <i>Staphylococcus aureus</i> master ke dalam media <i>nutrient agar</i> miring
Neraca Analitik	Menimbang bahan
Turbidimeter	Mengukur turbiditas
Spektrofotometer UV-Vis	Mengukur absorbansi

3.1.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dan kegunaannya ditunjukkan pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Bahan penelitian dan kegunaan.

Bahan Penelitian	Kegunaan
Gondorukem	Sumber asam resin yang berfungsi sebagai agen antimikroba
Hidrosol minyak daun jeruk purut	Sumber sitronellal yang berfungsi sebagai agen antimikroba
Texapon	Agen pembusa
NaOH	Untuk mempertahankan pH dan melarutkan gondorukem
<i>Aquadest</i>	Pelarut
<i>Nutrient agar</i>	Media pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Nutrient broth</i>	Media untuk pembuatan suspensi <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sebagai bakteri uji
CaCl ₂ anhidrat	Pembuatan larutan standar air sadah
MgCl ₂ .6H ₂ O	Pembuatan larutan standar air sadah

3.2. Variabel Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pencampuran gondorukem dan hidrosol minyak daun jeruk purut pada pembuatan pembersih lantai sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Komposisi rasio gondorukem dan hidrosol minyak daun jeruk purut akan divariasikan dalam pembuatan pembersih lantai dengan konsentrasi 4% bahan aktif yaitu 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 dan dilakukan pengenceran pada uji antimikroba dengan perbandingan cairan pembersih lantai terhadap air yaitu 1:250, 1:300, 1:350, 1:400 dan 1:450.

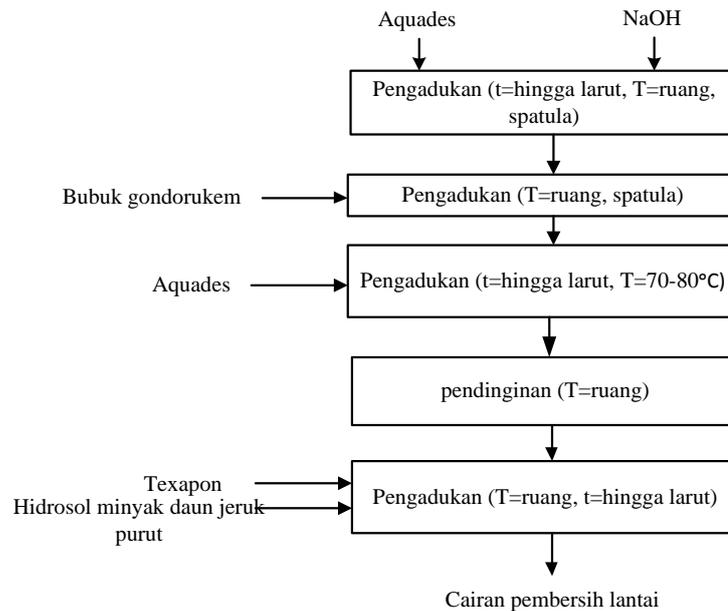
3.3. Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan pembersih lantai

Pembersih lantai dibuat dari campuran Gondorukem, hidrosol minyak daun jeruk purut, texapon, NaOH dan aquades. Aquades sebanyak 90 ml digunakan untuk melarutkan padatan NaOH, selanjutnya bubuk gondorukem dicampurkan ke dalam larutan NaOH. Sebelum pemanasan ditambahkan aquades sebanyak 10 ml. Gondorukem dipanaskan pada temperatur 70-80°C hingga larut sempurna. Kemudian ditambahkan texapon dan hidrosol minyak daun jeruk purut, setelah itu larutan didinginkan hingga temperatur ruang. Proses pembuatan cairan pembersih lantai ditunjukkan pada gambar 3.1 dan komposisi pembuatan pembersih lantai dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.3. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Pembuatan 100 gram Pembersih Lantai

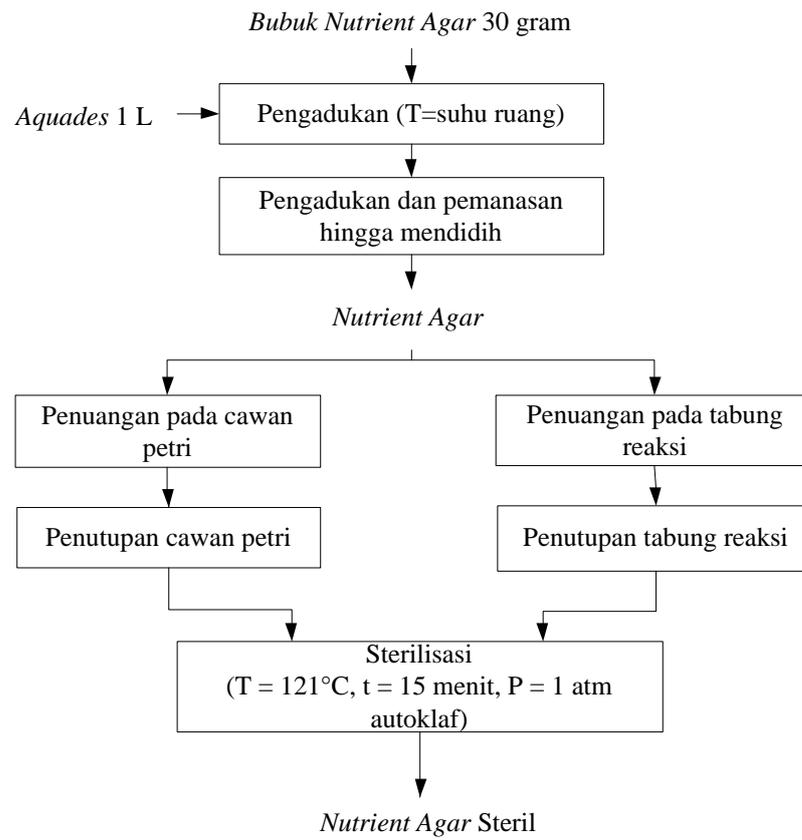
Komposisi	Rasio gondorukem : hidrosol minyak daun jeruk purut					
	1:0	0:1	1:1	2:1	1:2	1:3
Gondorukem (gram)	4	0	2	2,67	1,33	1
NaOH 17% excess	0,62	0	0,31	0,41	0,22	0,15
Hidrosol (gram)	0	4	2	1.33	2.67	3
Texapon (gram)	3,60	3,60	3,60	3,60	3,60	3,60
Air (ml)	91,78	92,40	92,10	91,90	92,20	92,30



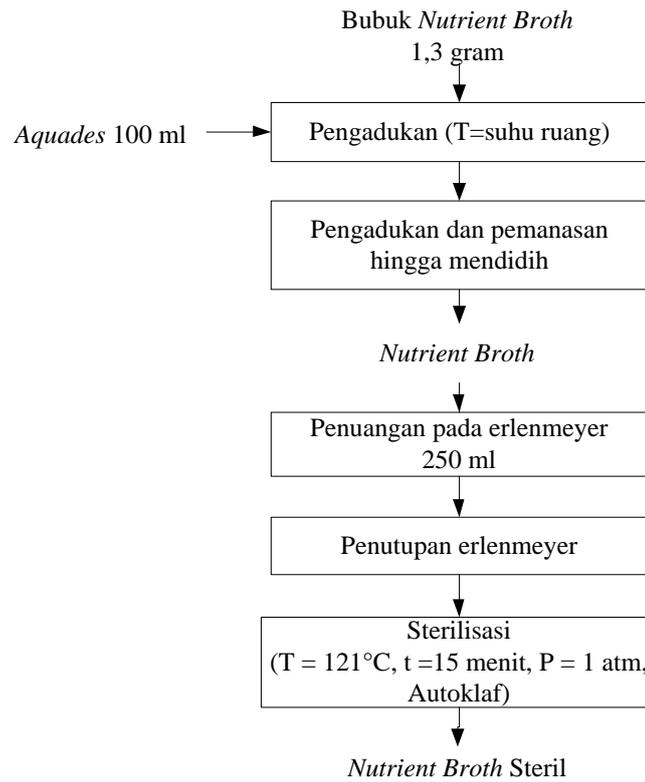
Gambar 3.1. Blok diagram proses pembuatan pembersih lantai

3.3.2 Pembuatan Media (Nutrient Agar dan Broth)

Pembuatan *nutrient agar* digunakan sebagai media pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sedangkan pembuatan media *nutrient broth* digunakan untuk pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*. *Nutrient agar* dibuat dengan melarutkan 30 gram bubuk *nutrient agar* ke dalam 1 L aquades kemudian dipanaskan dan diaduk hingga mendidih. Kemudian *nutrient agar* dituangkan ke dalam tabung reaksi untuk perbanyakan bakteri dan cawan petri untuk uji antimikroba. Tabung reaksi yang berisi *nutrient agar* ditutup dengan tutup yang terbuat dari kapas dan kasa, dilapisi aluminium foil, dan diselotip. Sedangkan untuk cawan petri dibungkus dengan kertas coklat dengan bagian mengkilat di bagian luar dan ditali. Setelah itu, disterilisasi menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Prosedur yang sama dilakukan untuk pembuatan *nutrient broth* dengan melarutkan 1,3 gram dalam 100 ml aquades. Blok diagram pembuatan *nutrient agar* ditunjukkan pada gambar 3.2. dan *nutrient broth* pada gambar 3.3.



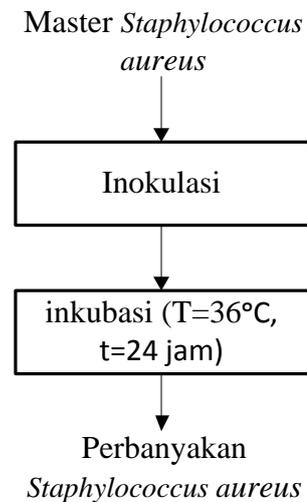
Gambar 3.2 Blok Diagram Pembuatan *Nutrient Agar*



Gambar 3.3. Blok Diagram Pembuatan *Nutrient Broth*

3.3.3 Perbanyakkan Bakteri *Staphylococcus aureus*

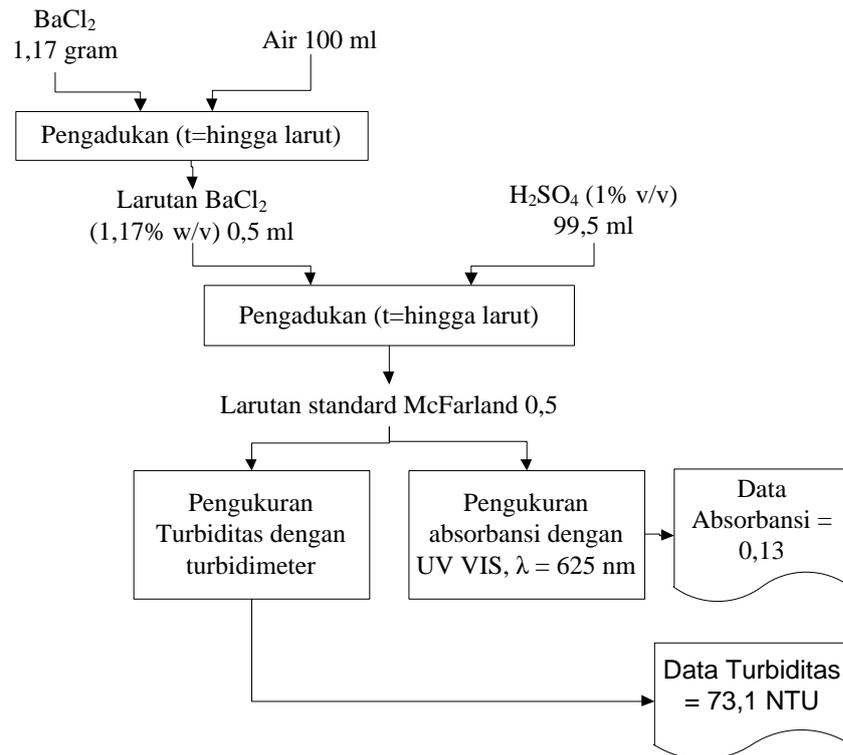
Sebelum uji antimikroba, dilakukan perbanyakkan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi ke dalam media nutrien agar miring dan dinkubasi pada suhu 36°C dalam inkubator selama 24 jam. Proses perbanyakkan *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada gambar 3.4.



Gambar 3.4. Blok diagram perbanyak bakteri *Staphylococcus aureus*

3.3.4 Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5

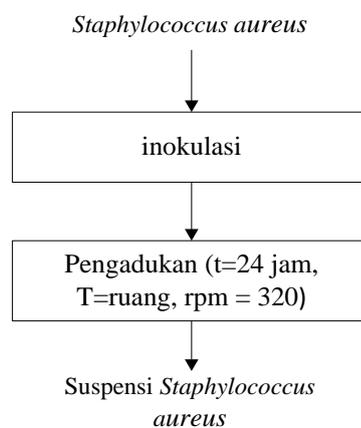
Larutan Standar McFarland 0,5 digunakan sebagai pembandingan dalam menentukan densitas suspensi *Staphylococcus aureus*. Larutan standar McFarland 0.5 dibuat dengan cara mencampurkan barium klorida (1,17% w/v) sebanyak 0,5 ml dengan H₂SO₄ (1% v/v) sebanyak 99,5 ml. Kemudian larutan yang didapat diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm, yang mana absorbansi yang sesuai untuk larutan standar McFarland adalah 0,08 – 0,13 (Wootton, 2013). Proses pembuatan larutan standar McFarland 0,5 ditunjukkan pada gambar 3.5.



Gambar 3.5. Pembuatan Larutan Standard McFarland 0,5

3.3.5 Pembuatan Suspensi *Staphylococcus aureus*

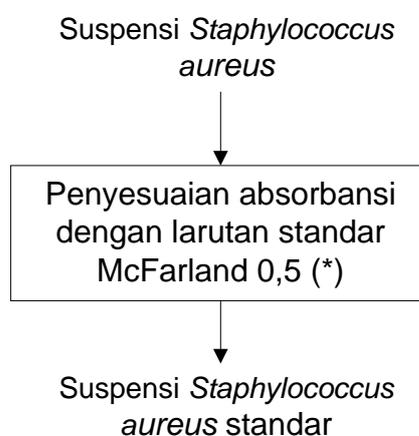
Suspensi *Staphylococcus aureus* dibuat dengan cara menginokulasi *Staphylococcus aureus* ke dalam 100 ml *nutrient broth* menggunakan erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya, *shaking* selama 24 jam dengan temperatur ruang dan dibandingkan turbiditasnya dengan larutan standar McFarland 0,5.



Gambar 3.6. Pembuatan Suspensi *Staphylococcus aureus*

3.3.6 Penyesuaian Absorbansi Suspensi *Staphylococcus aureus* terhadap Larutan Standar McFarlan 0,5

Larutan standar McFarlan 0,5 setara dengan densitas suspensi *Staphylococcus aureus* sebesar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml yang dilihat dari nilai absorbansi yang sama. Absorbansi suspensi *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan absorbansi dan turbiditas larutan standar McFarland 0,5 menggunakan UV VIS dan turbidimeter. Proses Penyesuaian Absorbansi Suspensi *Staphylococcus aureus* terhadap Larutan Standar McFarlan 0,5 ditunjukkan pada gambar 3.7.

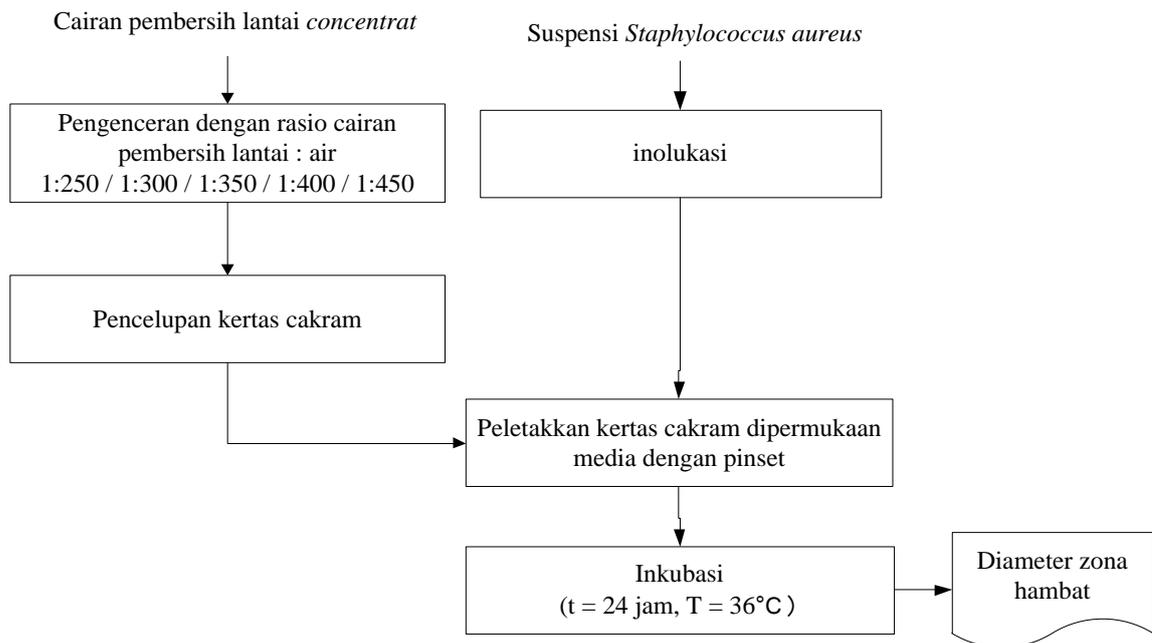


Gambar 3.7 Penyesuaian suspensi *Staphylococcus aureus* dengan larutan standar McFarland 0,5

Keterangan (*): Jika nilai absorbansi lebih tinggi, maka ditambahkan *distilled water* steril.

3.3.7 Uji Antimikroba

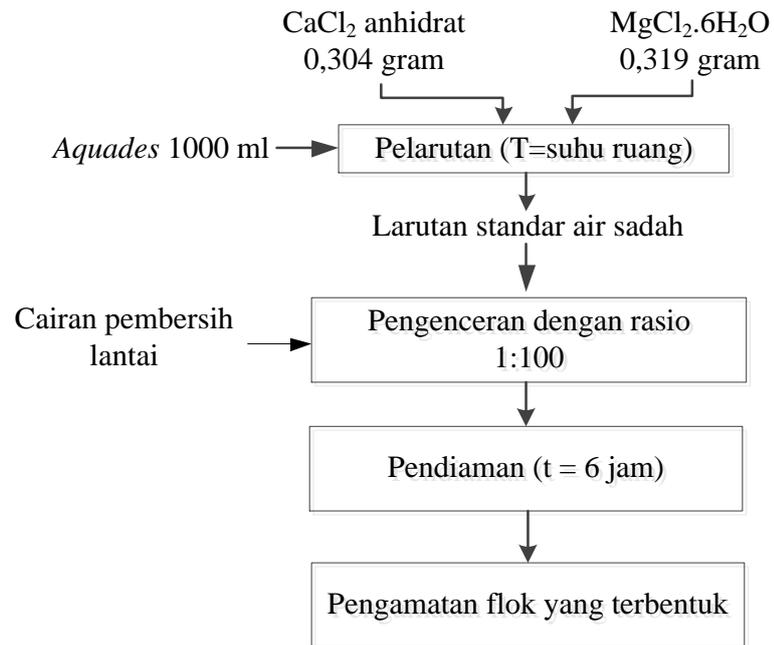
Uji antimikroba yang dilakukan menggunakan metode disk difusi, yaitu menggunakan kertas cakram yang mengandung antimikroba yang kemudian berdifusi pada media agar. Cairan pembersih lantai diencerkan terlebih dahulu dengan variasi rasio pengenceran cairan pembersih lantai : air sebesar 1:250; 1:300; 1:350; 1:400; 1:450. Kemudian kertas cakram dicelupkan pada cairan pembersih lantai, setelah itu diletakkan pada cawan petri yang sudah berisi *Staphylococcus aureus*. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 36°C kemudian diamati diameter zona hambat. Prosedur uji antimikroba dapat dilihat pada gambar 3.8.



Gambar 3.8. Blok Diagram Uji Antimikroba

3.3.8 Uji Flokulasi Cairan Pembersih Lantai dalam Air Sadah

Uji flokulasi cairan pembersih lantai dalam air sadah bertujuan untuk mengetahui apakah terbentuk flok dari pencampuran sampel cairan pembersih lantai dengan air sadah. Larutan standar air sadah dibuat dengan melarutkan 0,304 gram CaCl_2 anhidrat dan 0,319 gram $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam labu ukur 1000 ml. Kemudian dilakukan pengenceran sampel dalam air sadah dengan perbandingan 1:100. Pengujian dilakukan dengan mendiamkan larutan selama enam jam, kemudian diamati apakah terbentuk endapan dari larutan tersebut. Prosedur uji stabilitas emulsi air sadah dapat dilihat pada gambar 3.9.



Gambar 3.9. Blok Diagram Uji Flokulasi Cairan Pembersih Lantai Dalam Air Sadah