

BAB III

OBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan, Alat dan Objek Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

1. Media Mueller-Hinton Agar;
2. Eritromisin sebagai kontrol positif;
3. NaCL;
4. Standar turbiditas McFarland 0,5;
5. Aquadest;
6. Mueller-Hinton Broth

3.1.2 Alat Penelitian

1. Inkubator;
2. Oven;
3. Spidol;
4. Masker;
5. *Hand gloves*;
6. Blender;
7. Pisau;

8. Kain katun;
9. Cawan petri;
10. Ose;
11. *Cotton swab* steril;
12. Jangka sorong;
13. Gelas ukur;
14. Tabung reaksi;
15. Botol steril
16. Autoklaf;
17. Pipet;
18. *Whatman filter paper* nomor 1 berdiameter 3 mm;

3.1.3 Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* koleksi Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung, buah nanas (*Ananas comosus L*) yang berasal dari perkebunan buah nanas di Subang Jawa Barat dan air perasan daging buah nanas (*Ananas comosus L*) yang dibuat di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung.

1. Kriteria inklusi : Biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* koleksi Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung.
2. Kriteria eksklusi : Biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang terkontaminasi.

3.2 Jumlah Pengulangan dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan besar sampel pada penelitian ini dengan menggunakan rumus

Frederer sebagai berikut:

$$(r - 1)(t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

r = Jumlah pengulangan sampel

t = Jumlah kelompok perlakuan

$$(r - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)(6 - 1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, maka didapatkan besar pengulangan sampel yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 4 kali pengulangan.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian metode penelitian eksperimental Laboratrium secara *in vitro* yang dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung. Metode yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi untuk menentukan aktivitas antibakteri.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang termasuk dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : Konsentrasi air perasan daging buah nanas
2. Variabel terikat : Zona hambat bakteri dari air perasan daging buah nanas terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*, konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari air perasan daging buah nanas (*Ananas comosus L*) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.
3. Variabel terkontrol : Waktu inkubasi *Streptococcus pyogenes*, medium pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, dan suhu inkubasi

3.3.3 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur	Skala
1	Zona Hambat Bakteri	Diameter zona hambat disekitar cakram, diukur oleh jangka sorong	Diameter dalam milimeter (mm)	Numerik
2	Konsentrasi Hambat Minimum	Konsentrasi air perasan daging buah nanas yang dibutuhkan untuk menghambat bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> menggunakan metode dilusi yang diukur dengan melihat kekeruhan. Dinyatakan KHM apabila menunjukkan bening.	Konsentrasi dalam persen (%)	Numerik
3	Konsentrasi Bunuh Minimum	Konsentrasi air perasan daging buah nanas yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> menggunakan metode dilusi. Dinyatakan sebagai KBM apabila tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri.	Konsentrasi dalam persen (%)	Numerik
4	Air perasan daging buah nanas	Daging buah nanas yang diperas lalu di blender dan di saring hingga di dapatkan air perasan daging buah nanas	Konsentrasi dalam 100%	Numerik

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Air Perasan Daging Buah Nanas

Nanas yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari perkebunan nanas di Subang Jawa Barat. Pembuatan air perasan daging buah nanas dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung.

1. Buah nanas dipisahkan terlebih dahulu dari bonggol dan kulitnya menggunakan pisau.
2. Buah nanas dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan aquades steril.
3. Daging buah yang telah dicuci kemudian di potong menjadi bagian yang lebih kecil.
4. Potongan daging tersebut kemudian melalui proses penghalusan menggunakan blender hingga halus.
5. Hasil nya kemudian diperas dan disaring menggunakan kain katun.
6. Air perasan daging buah nanas tersebut dimasukan ke dalam botol steril dengan penutup berbahan karet.

3.4.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri melalui proses sebagai berikut:

1. Bakteri *Streptococcus pyogenes* biakan yang sudah disiapkan diambil menggunakan ose.
2. Bakteri kemudian dicampurkan dengan NaCl 0,9% dan homogenkan.
3. Melihat kekeruhan dan disesuaikan dengan standar turbiditas McFarland yang dibuat dari barium klorida (BaCl_2) dan asam sulfat (H_2SO_4). Hal ini dilakukan

sebagai perbandingan antara jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dan standard McFarland 0,5 menggunakan kertas dengan latar belakang garis atau tulisan hitam putih.

3.4.3 Pembuatan Agar Mueller-Hinton

Pembuatan agar Mueller-Hinton melalui proses sebagai berikut:

1. Agar Mueller-Hinton cair yang masih panas dituangkan ke dalam cawan
2. Kemudian homogenisasi dengan cara menggoyangkan cawan.
3. Cawan ditutup dan diamankan sampai mengeras.

3.4.4 Persiapan Cakram Air Perasan Daging Buah Nanas

Cakram yang digunakan merupakan *Whatman filter paper* nomor 1 berdiameter 3 mm yang distrerilkan sebelumnya dengan autoklaf. Kemudian kertas cakram direndam dalam air perasan daging buah nanas dengan konsentrasi 100%, diangkat lalu direndam kembali hingga semuanya benar-benar menyerap. Aquades sebagai kontrol negatif dan eritromisin sebagai kontrol positif tunggu hingga meresap ke seluruh bagian dari kertas cakram.

3.4.5 Prosedur Uji Sensitivitas Metode Difusi

3.4.5.1 Prosedur inokulasi pada media

1. Gunakan *cotton swab* steril.
2. *Cotton swab* kemudian dicelupkan ke dalam suspensi bakteri.

3. Suspensi yang berlebihan dituangkan dengan cara menekan cotton swab pada dinding tabung.
4. *Cotton swab* kemudian digoreskan ke permukaan agar sebanyak 2 kali sampai seluruh permukaan homogen.

3.4.5.2 Penempelan Cakram Pada Media

1. Siapkan cakram yang telah direndam dengan konsentrasi 100%, aquades sebagai kontrol negatif dan eritromisin sebagai kontrol positif.
2. Cakram kemudian diletakan di atas media yang sebelumnya telah diinokulasi.
3. Tiap cakram dipastikan kontak langsung dengan permukaan media secara keseluruhan.
4. Jarak antara cakram dengan yang lainnya minimal 24 mm.
5. Inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam pada inkubator.

3.4.5.3 Pembacaan Hasil dan Interpretasi

1. Setelah diinkubasi, setiap cawan diamati zona inhibisi berwarna bening yang tidak ditumbuhi bakteri.
2. Diameter dari zona hambat diukur dengan satuan milimeter menggunakan jangka sorong.
3. Sensitif jika zona hambat menunjukkan lebih besar dari kontrol positif atau sama seperti kontrol positif.
4. Intermediet jika zona hambat setidaknya 2 milimeter dan perbedaan antara kontrol positif dengan tes minimal 3 milimeter.
5. Resisten jika tidak terdapat zona hambat.

3.4.6 Prosedur Uji Konsentrasi Hambat Minimal Metode Dilusi

Uji konsentrasi hambat minimal dengan metode dilusi melalui prosedur sebagai berikut:.

1. MHB sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung II, III, IV, V reaksi yang telah disiapkan
2. Ambil 2 ml air perasan daging buah nanas dengan konsentrasi 100% dimasukkan ke tabung I.
3. Sebanyak 1 ml larutan dari tabung I diambil kemudian masukkan ke tabung II.
4. Sebanyak 1 ml larutan dari tabung II diambil kemudian masukkan ke tabung III.
5. Sebanyak 1 ml larutan dari tabung III diambil kemudian masukkan ke tabung IV.
6. Sebanyak 1 ml larutan dari tabung IV diambil kemudian masukkan ke tabung V.
7. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 dimasukkan ke tabung I, II, III, IV, V dan VI.
8. Pada tabung VI hanya dimasukkan 1 ml suspensi bakteri dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 dan 1 ml MHB sebagai kontrol negatif.
9. Inkubasi dengan suhu 37° C selama 24 jam.
10. Amati kekeruhan pada masing-masing tabung I konsentrasi 100%, tabung II konsentrasi 50%, tabung III konsentrasi 25%, tabung IV konsentrasi 12,5%, tabung V konsentrasi 6,25% kemudian amati konsentrasi hambat minimal (KHM).

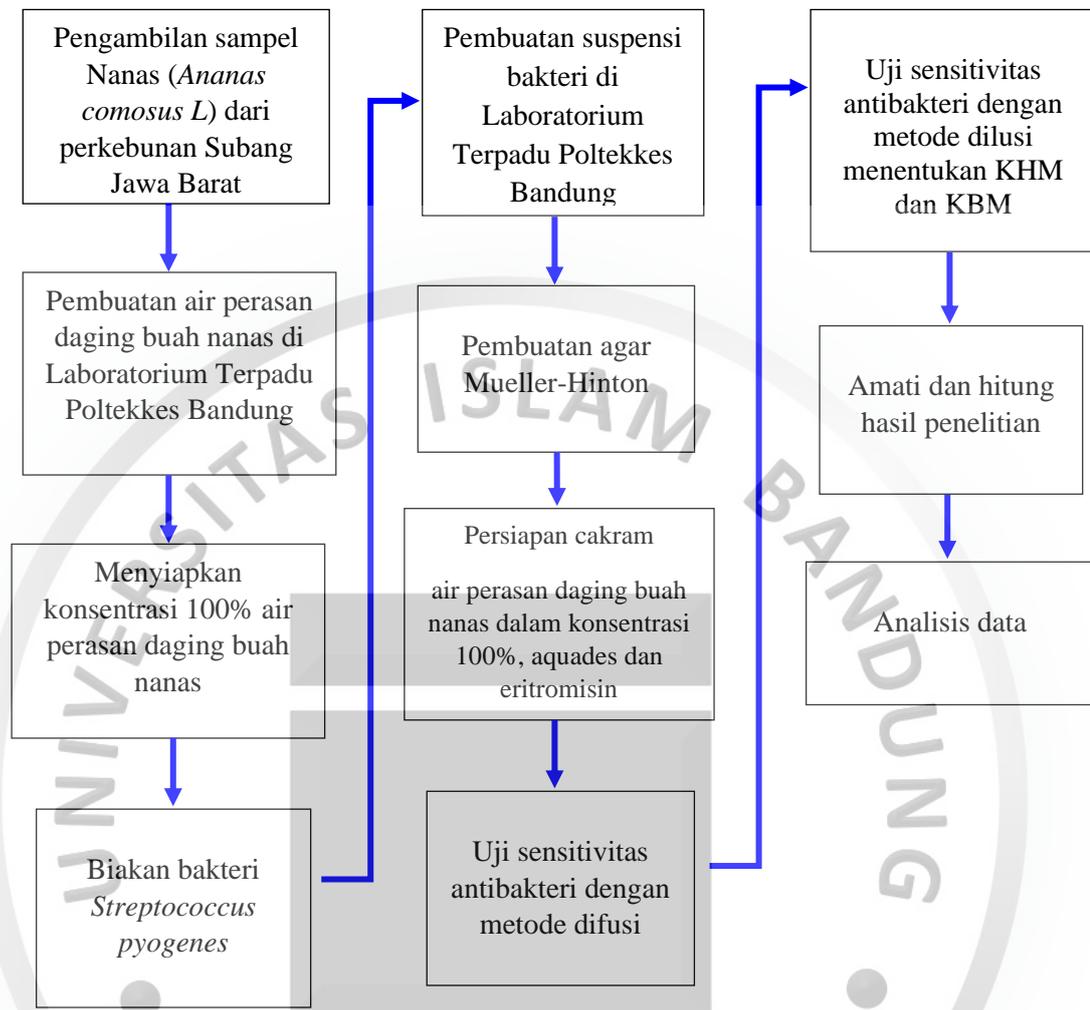
11. Konsentrasi hambat minimal (KHM) menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri atau terlihat tidak keruh

3.4.7 Prosedur Uji Konsentrasi Bunuh Minimal Metode Dilusi

Uji konsentrasi bunuh minimal dengan metode dilusi melalui prosedur sebagai berikut :

1. Ambil suspensi dari tiap tabung KHM dengan menggunakan ose lalu goreskan pada media agar *Mueller-Hinton*.
2. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.
3. Konsentrasi yang menunjukkan tidak terdapat pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai konsentrasi bunuh minimal (KBM).

3.5 Skema dan Alur penelitian



Gambar 3. 1 Skema dan Alur Penelitian

3.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung dari bulan Maret hingga Agustus 2019 dan menganalisis hasil penelitian dilakukan dari bulan September hingga Desember 2019.

3.7 Etik Penelitian

1. Objek penelitian atau bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan biologis tersimpan yang dikembangkan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung, oleh karena itu peneliti tidak berhubungan langsung dengan objek penelitian sehingga aspek etik minimal. Untuk menghormati bahan biologi tersimpan tersebut maka diteliti dengan metode secara ilmiah.
2. Setiap kegiatan yang dilakukan dalam penelitian ini harus mendapatkan izin dari instansi terkait. Seperti permintaan izin melakukan penelitian di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung.
3. Pemusnahan dilakukan setelah penelitian selesai bertujuan untuk membunuh bakteri yang dapat menyebabkan penyakit serta memusnahkan media yang dapat menularkan penyakit. Prosedur tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan autoklaf.
4. Setiap prosedur yang dilakukan oleh peneliti dilakukan secara sistematis dan berdasarkan ilmiah.