

BAB III

OBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Objek, Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Objek Penelitian

Bakteri uji yang diteliti pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang di biakkan di Laboratorium Politeknik Analisis Kesehatan Bandung (Poltekkes Bandung).

- Kriteria inklusi: biakkan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dikoleksi dari Laboratorium Poltekkes Bandung.
- Kriteria eksklusi: biakkan bakteri *Staphylococcus aureus* yang terkontaminasi.

Objek yang digunakan pada penelitian adalah Lidah Buaya (*Aloe Vera L.*) yang diolah menjadi Ekstrak Etanol Lidah Buaya di Laboratorium Politeknik Analisis Kesehatan Bandung. Lidah Buaya yang diperoleh dari perkebunan di Lembang Bandung, serta antibiotik *Eritromisin* yang diperoleh dari salah satu Apotek di Bandung sebagai kontrol positif.

3.1.2 Alat & Bahan Penelitian

Alat dan bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Inkubator
- b. Cawan petri
- c. Tabung Erlenmeyer
- d. Jarum ose

- e. Mikroskop
- f. Gelas beker
- g. Gelas ukur
- h. Alumunium foil
- i. Kaca objek
- j. Penutup kaca objek
- k. Pengaduk
- l. Hand gloves
- m. Pipet hisap
- n. Agar MSA
- o. NaCl Fisiologis

3.2 Jumlah Sampel

Penetapan besar sampel pada penelitian ini dengan menggunakan Rumus Frederer.

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

Keterangan: r: pengulangan jumlah sampel

t: jumlah kelompok perlakuan

- a. Metode Difusi

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

$$(r-1)(2-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 16$$

Berdasarkan perhitungan, maka didapatkan 16 kali pengulangan tiap perlakuan. Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 16 kali pengulangan dengan 2 perlakuan sehingga total sampel $16 \times 2 = 32$ sampel.

b. Metode Dilusi

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan, maka didapatkan 4 kali pengulangan tiap perlakuan. Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 4 kali pengulangan dengan 6 perlakuan sehingga total sampel $4 \times 6 = 24$ sampel.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium secara *in vitro*.

3.3.2 Variabel Penelitian

- Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak etanol lidah buaya.
- Variabel terikat: Efek antibakteri, KHM, dan KBM bakteri *Staphylococcus aureus*.
- Variabel Terkendali : Lamanya waktu inkubasi, suhu inkubasi, dan media pertumbuhan.



3.3.3 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Zona Hambat Bakteri	Diameter zona hambat disekitar cakram yang diukur menggunakan jangka sorong.	Diameter dalam milimeter (mm)	Ordinal
2	Konsentrasi Hambat Minimal	Konsentrasi ekstrak etanol lidah buaya minimal yang dibutuhkan untuk menghambat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan metode dilusi yang diukur dengan mengamati kekeruhan pada reaksi tersebut. Dinyatakan KHM apabila tidak menunjukkan kekeruhan pada reaksi.	Konsentrasi dalam persen (%)	Numerik
3	Konsentrasi Bunuh Minimal	Konsentrasi ekstrak etanol lidah buaya minimal yang dibutuhkan untuk membunuh pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan metode dilusi. Dinyatakan sebagai KBM apabila tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri.	Konsentrasi dalam persen (%)	Numerik
4	Ekstrak Etanol Lidah Buaya	Ekstrak yang didapat melalui teknik maserasi dan di tambah dengan pelarut etanol.	Konsentrasi dalam persen (%)	Numerik

3.3.4 Prosedur Penelitian

3.3.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Lidah Buaya

Pada penelitian ini lidah buaya yang digunakan diambil dari Lembang Bandung. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Politeknik Analisis Kesehatan.

- a. Lidah buaya dicuci, dibersihkan, dan dikupas.
- b. Setelah itu dikeringkan dalam mesin pengering dengan suhu 60°C selama 3 hari.
- c. Setelah kering lidah buaya kemudian dihaluskan dengan blender sampai menjadi bubuk kasar.
- d. Ekstraksi lidah buaya dilakukan dengan menambahkan pelarut etanol 96% selama 48 jam dalam maserator.

3.3.4.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

- a. Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari stok menggunakan ose.
- b. Kemudian bakteri dicampurkan dengan larutan salin fisiologis 0,9% dan di homogenkan.
- c. Kekeruhan disesuaikan dengan standar turbiditas McFarland 0,5 (0,05 ml BaCl₂ konsentrasi 1% dicampurkan dengan 9,95 ml H₂SO₄ dengan konsentrasi 1%) setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

3.3.4.3 Pembuatan Agar Mueller-Hinton

- a. Agar Mueller-Hinton cair yang masih panas dituangkan ke dalam cawan sampai tinggi agar 4 mm. Untuk cawan dengan ukuran diameter 10 cm membutuhkan Mueller-Hinton agar cair sebanyak 30 ml.
- b. Kemudian homogenisasi dengan cara menggoyangkan cawan.
- c. Cawan ditutup dan diamkan sampai mengeras.

3.3.4.4 Persiapan Cakram Ekstrak Etanol Lidah Buaya

Kertas saring yang digunakan adalah *Whatman filter paper* nomor 1 dengan diameter 5 mm dengan bentuk cakram yang disterilisasikan terlebih dahulu dengan autoklaf. Kemudian ekstrak etanol lidah buaya konsentrasi 100% dan antibiotik *eritromisin* diteteskan ke kertas saring, lalu tempatkan diatas media agar Mueller-hinton.

3.3.4.5 Prosedur Uji Sensitivitas Metode Difusi

a. Prosedur inokulasi pada media

- 1) Gunakan cotton swab steril.
- 2) Cotton swab steril tersebut dicelupkan ke dalam suspensi bakteri.
- 3) Suspensi yang berlebihan dituangkan dengan cara menekan cotton swab pada dinding tabung.
- 4) Cotton swab digoreskan ke seluruh permukaan agar sebanyak 2 kali sampai seluruh permukaan homogen.

b. Penempelan Cakram Pada Media

- 1) Siapkan cakram dengan konsentrasi ekstrak etanol lidah buaya 100% dan *eritromisin* (kontrol positif).

- 2) Cakram diletakan di atas media yang telah diinokulasi.
- 3) Tiap cakram ditekan untuk memastikan kontak dengan permukaan agar secara keseluruhan.
- 4) Jarak cakram satu dengan lainnya minimal 24 mm.
- 5) Inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam pada inkubator.

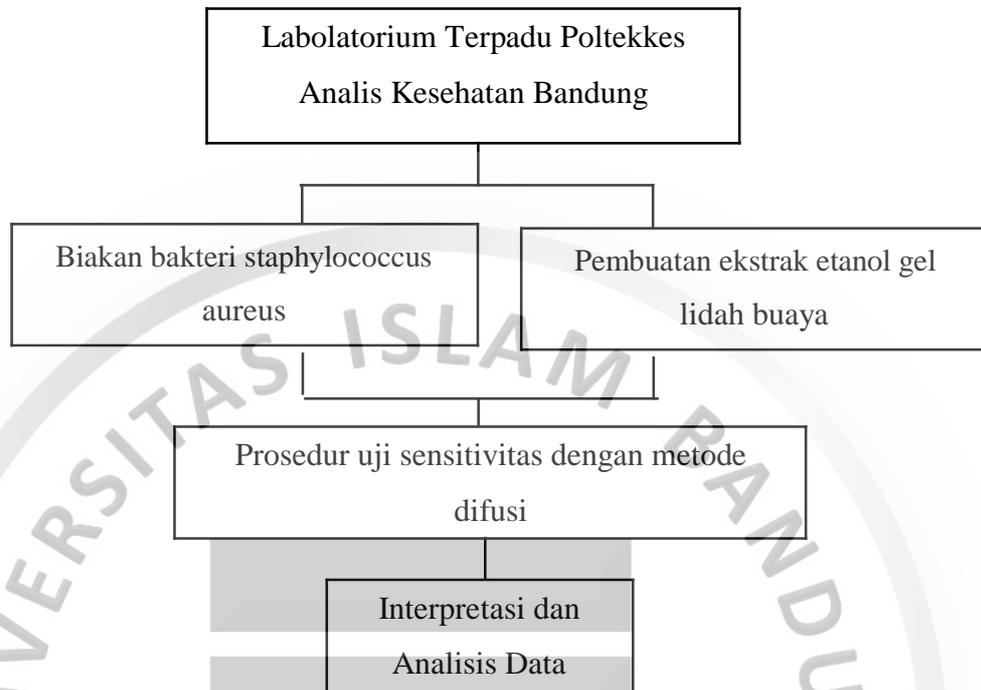
c. Pembacaan Hasil

- 1) Setelah diinkubasi, amati zona inhibisi yang akan muncul sebagai area sirkuler berwarna bening yang tidak ditumbuhi bakteri.
- 2) Diameter dari zona hambat diamati dan diukur dengan satuan milimeter menggunakan jangka sorong.

d. Interpretasi hasil

- Sensitif (S): zona hambat lebih besar atau sama dengan kontrol. Apabila zona hambat tes lebih kecil dari kontrol maka perbedaanya tidak lebih dari 3 mm.
- Intermediet (I): perbedaan zona hambat antara kontrol dan tes minimal 3 mm.
- Resisten (R): tidak terdapat zona hambat.

3.3.5 Skema dan Alur Penelitian



3.3.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini di Poltekkes Bandung pada tahun 2019.

3.3.7 Aspek Etik Penelitian

- a. Bakteri yang telah ditentukan harus sesuai standar.
- b. setiap prosedur yang dilakukan di laboratorium Poltekkes Bandung untuk biakan bakteri dan uji sensitivitas harus sudah terstandar. Serta laboratorium harus memiliki standar *Chemical safety*, *Fire Safety*, *Electrical Safety*, dan *Biosafety* yang bisa menjaga peneliti serta laboran dari bahaya kebakaran, bahaya kimia, bahaya tersengat listrik dan bahaya yang ditimbulkan oleh bakteri patogen yang diteliti.
- c. Setelah prosedur penelitian selesai maka setiap bakteri yang digunakan harus dimusnahkan menggunakan autoklaf untuk mencegah penyebaran yang tidak diinginkan.
- d. Setiap proses yang dilakukan oleh peneliti dilakukan secara sistematis dan berdasarkan ilmiah.