

BAB III

SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

3.1.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni secara *in vitro* yang dilakukan di laboratorium terpadu Politeknik Kesehatan Bandung, Cimahi. Metode yang digunakan adalah metode difusi agar dengan sumuran menggunakan *Mueller Hinton agar* untuk menentukan aktivitas antibakteri.

3.2 Objek dan Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah

1. Air Zamzam sebanyak 1200 ml yang di dapatkan dari Kota Mekah;
2. Siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif untuk bakteri *Salmonella typhi* dan Eritromisin untuk bakteri *Streptococcus pyogenes*;
3. Biakan *Salmonella typhi* dan biakan *Streptococcus pyogenes*;
4. *Mueller Hilton agar*;
5. Aquades.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Inkubator;
2. Laminar air flow cabinet;
3. Cawan petri;
4. Jangka sorong;
5. Gelas ukur;
6. Tabung reaksi;
7. Otoklaf;
8. Waterbath;
9. Pipet;
10. Oase;
11. *Hand gloves*;
12. Media kultur (*TSA blood agar* untuk *Streptococcus pyogenes* dan *Shigella-Salmonella Agar* untuk *Salmonella typhi*);
13. *Cark Bore*.

3.2.3 Objek Penelitian

Bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* yang di biakan di Laboratorium Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi.

- a. Kriteria inklusi: biakan *Streptococcus pyogenes* dan biakan *Salmonella typhi*
- b. Kriteria eksklusi: biakan *Streptococcus pyogenes* dan *Salmonella typhi* yang tercampur bakteri lain.

3.3 Besar Sampel

Pada penelitian ini sampel yang di gunakan adalah air Zamzam, Siprofloksasin dan Eritromisin sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif untuk mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Untuk menentukan besar sampel pada penelitian ini digunakan rumus Federer.

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

$$(r-1)(12-1) \geq 15$$

$$(r-1) \times 11 \geq 15$$

$$(12r-11) \geq 15$$

$$r \geq 2,16$$

Keterangan:

r = banyaknya sampel (pengulangan)

k = banyaknya perlakuan

berdasarkan hasil di atas besar sampel yang digunakan adalah 2,16 Untuk untuk memenuhi standar etik penelitian maka akan di bulatkan menjadi 3 yang akan menjadi acuan untuk melakukan pengulangan pada penelitian ini dan media yang saya gunakan sebanyak 6 sampel untuk 3 kali pengulangan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Prosedur Persiapan Air Zamzam

Prosedur penyiapan air Zamzam adalah sebagai berikut

1. Air Zamzam di dapat dari Kota Mekah yang telah di validasi.

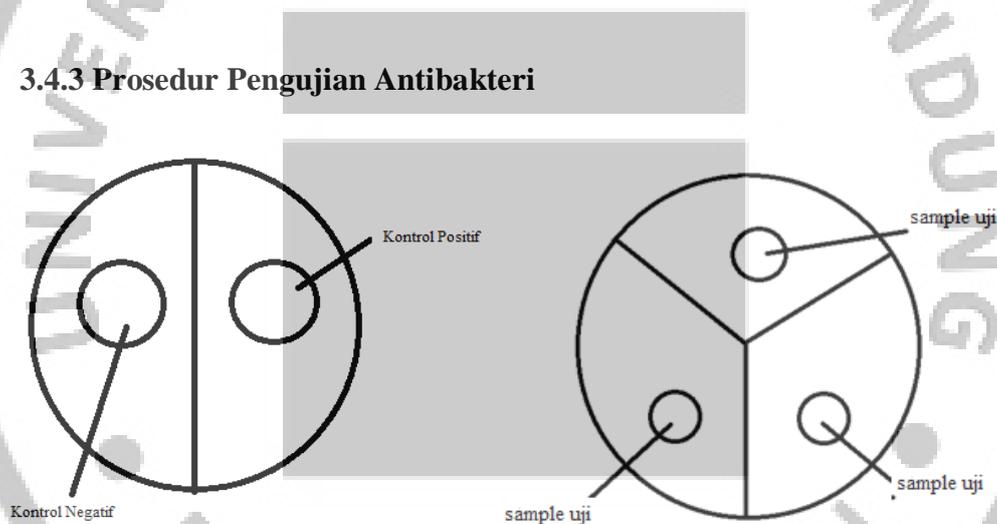
2. Air Zamzam di simpan dalam botol kosong yang tidak tercampur dengan cairan dan zat lainnya.

3.4.2 Pembuatan Agar Mueller-Hinton

Agar Mueller-Hinton dibuat sebagai berikut:

1. Agar Mueller-Hinton cair yang masih panas dituangkan ke dalam cawan hingga mencapai tinggi agar 4 mm. Untuk cawan dengan ukuran diameter 10 cm membutuhkan *Mueller-Hinton agar* cair sebanyak 30 ml;
2. Lalu goyangkan cawan untuk menghomogenisasi;
3. Tutup cawan hingga agar mengeras.

3.4.3 Prosedur Pengujian Antibakteri



Gambar 3. 4 Prosedur Pengujian Antibakteri

Aktivitas antibakteri air Zamzam dilakukan menggunakan metode difusi dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Dibuat 3 buah sumur dengan kedalaman 4 mm dan diameter 1cm pada agar;
2. *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* ditanam pada media *Mueller Hinton agar*;

3. Sumur di tetesi 3 ml air Zamzam, Siprofloksasin untuk kontrol positif *Salmonella typhi*, Eritromisin untuk kontrol positif bakteri *Streptococcus pyogenes* dan aquades untuk kontrol negatif
4. Inkubasi selama 24 jam, dan 72 jam pada suhu 37°C;
5. Zona hambat terbentuk dengan ditandai adanya area bening disekitar perlakuan menandakan tidak ada koloni bakteri di area tersebut.
6. Interpretasi hasil:
 - Sensitif : diameter zona bening sama dengan zona bening pada kontrol positif atau lebih dari kontrol positif
 - *Intermediet*: diameter zona bening 20 mm dan perbedaan dengan kontrol positif tidak lebih dari 30 mm
 - Tidak ada anti bakteri: diameter zona bening <10 - 15mm

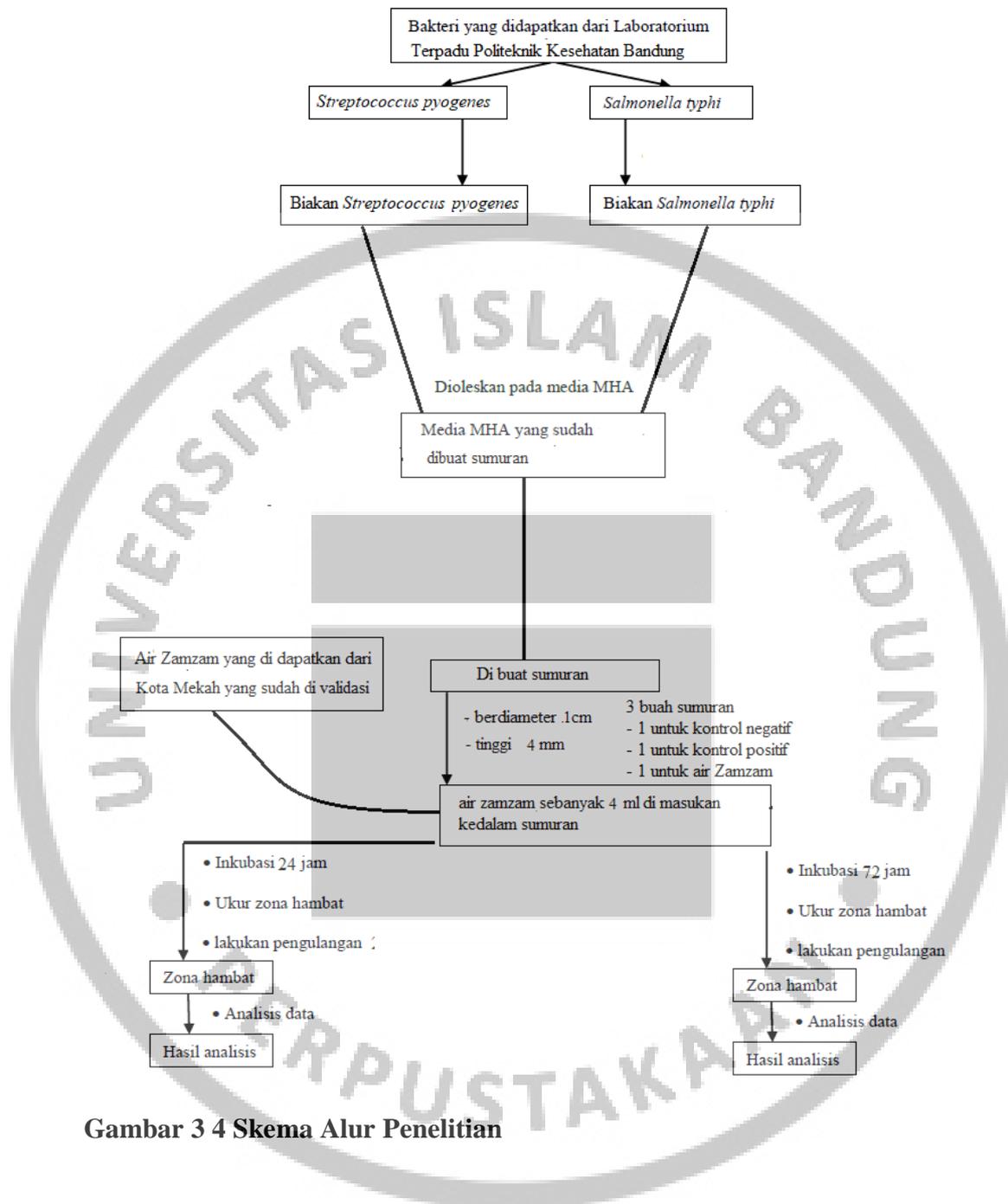
3.4.4 Kelompok Perlakuan Biakan *Streptococcus pyogenes* :

1. Kelompok I: *Streptococcus pyogenes* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebanyak 3 ml sebagai (sampel 1);
2. Kelompok II: *Streptococcus pyogenes* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebanyak 3 ml (sampel 2)
3. Kelompok III: *Streptococcus pyogenes* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebanyak 3ml (sampel 3)
4. Kelompok IV: *Streptococcus pyogenes* pada media Mueller Hinton agar + Disk Eritromisin (kontrol positif)
5. Kelompok V: *Streptococcus pyogenes* pada media Mueller Hinton agar + aquades sebanyak 3ml (kontrol negatif)

3.4.5 Kelompok Perlakuan Biakan *Salmonella typhi*:

1. Kelompok VI: *Salmonella typhi* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebanyak 3 ml sebagai (sampel 1);
2. Kelompok VII: *Salmonella typhi* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebanyak 3 ml (sampel 2)
3. Kelompok VIII: *Salmonella typhi* pada media Mueller Hinton agar + air Zamzam sebagai (sampel 3)
4. Kelompok IX: *Salmonella typhi* pada media Mueller Hinton agar + disk Siprofloksasin (kontrol positif)
5. Kelompok X: *Salmonella typhi* pada media Mueller Hinton agar + aquades (kontrol negatif)

3.5 Alur Penelitian



Gambar 3 4 Skema Alur Penelitian

3.6 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 3 ,yaitu:

1. Variabel bebas, yaitu air Zamzam
2. Variable terikat, yaitu zona bening pada biakan *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* yang di beri air Zamzam
3. Variabel terkendali adalah bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*, Muller Hinton agar, waktu inkubasi, dan suhu inkubasi.

3.7 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 7 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala
Air Zamzam	Air yang murni berasal dari mekkah dan tidak terkontaminasi oleh cairan maupun zat lain.	Mililiter	Nominal
Efek antibakteri	Kemampuan zat untuk menekan maupun menghancurkan pertumbuhan bakteri, dinilai melalui perhitungan zona bening.	Diameter dalam Milimeter	Nominal
Siprofloksasin	Merupakan antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif untuk uji pada bakteri <i>Salmonella typhi</i> .	Mililiter	Nominal
Eritromisin	Merupakan antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif untuk uji pada bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> .	Mililiter	Nominal

3.8 Tempat dan Waktu Penelitian

3.8.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi.

3.8.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2019.

3.8.3 Aspek Etik Penelitian

Objek penelitian ini menggunakan Bahan Biologi Tersimpan (BBT), maka pelaksanaan digunakan etika penelitian yaitu :

1. Pra-Penelitian

a. Pengambilan Bakteri

- Bakteri diambil dari Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi.
- Bakteri yang diambil merupakan bakteri biakan yang dikembangkan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi.

b. Pembiakan Bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi dengan prosedur kultur yang telah ditetapkan di laboratorium tersebut.

2. Penelitian

a. Lokasi

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung Cimahi.

b. Keamanan (*safety*)

- *Chemical Safety*

Laboratorium memiliki standar untuk melakukan penelitian, bahan kimia yang sudah memiliki label keamanannya.

- *Fire Safety*

Laboratorium memiliki akses evakuasi jika terjadi kebakaran.

- *Biosafety*

Setiap individu yang mengerjakan harus terhindar dari infeksi yang diakibatkan oleh objek penelitian.

c. Pengendalian (*Control*)

- *Control Plan*

Penanggung jawab dari laboratorium seperti orang yang mendampingi ketika melakukan eksperimen, bertanggung jawab untuk membuang sisa penelitian, alat penelitian, prosedur pengerjaan yang benar dan *post-exposure plan*.

- *Engineering Control*

i. *Laboratory environment*

Tempat penelitian harus memiliki sirkulasi udara yang baik, laboratorium memiliki kulkas, *centrifuges*, incubator untuk memproses penelitian,

serta memisahkan bahan-bahan yang berbahaya dari yang rendah hingga ke tinggi.

ii. *Biological safety cabinet (BSC)*

Pengerjaan penelitian di lakukan *laminar air flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

iii. *Post-exposure control*

Setelah melakukan kegiatan peneliti harus melaporkan kejadian atau kendala yang terjadi pada saat penelitian kepada penanggung jawab.

3. Post-Penelitian

Pemusnahan dilakukan bertujuan untuk membunuh bakteri yang dapat menyebabkan penyakit dan membersihkan peralatan yang dapat menularkan penyakit menggunakan *autocl*