

BAB III

OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Objek dan Bahan Penelitian

3.1.1 Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *Streptococcus pyogenes* yang telah dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi STIKES Achmad Yani Bandung.

- Kriteria inklusi :

Biakan *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh sesuai kurva pertumbuhan.

- Kriteria eksklusi :

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang terkontaminasi.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Fraksi etil asetat daun sirsak yang dimaserasi di Laboratorium Kimia Universitas Padjadjaran.
2. Media biakan *Streptococcus pyogenes* TSA blood agar (*Trypticase soy agar* ditambah 5% darah domba)
3. *Bacitracin disc* sebagai kontrol positif yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi STIKES Achmad Yani.

3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Inkubator
2. *Laminar air flow cabinet* (Nuair)
3. Cawan petri
4. Tabung Erlenmeyer
5. Jarum ose
6. Mikroskop
7. Gelas beker
8. Gelas ukur
9. Alumunium foil
10. Autoclave
11. Kaca objek
12. Penutup kaca objek
13. Pengaduk
14. *Hand gloves*
15. Pipet hisap
16. Jangka sorong

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan dengan metode eksperimental murni *in vitro*.

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Variabel bebas : Konsentrasi fraksi etil asetat daun sirsak.

- Variabel terikat : Efek antibakteri fraksi etil asetat daun sirsak terhadap *Streptococcus pyogenes* (Zona hambat, KHM, KMB).
- Variabel terkontrol: waktu inkubasi, media pertumbuhan, suhu inkubasi, kadar CO₂.

3.2.2.1 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur	Skala
1	Uji Antibakteri	Merupakan suatu pengukuran potensi agen antibakteri dalam konsentrasi tertentu yang terbagi menjadi Zona hambat, KHM, KBM.	Diameter dalam Sentimeter dan Konsentrasi dalam persen (%)	Interval
2	Zona Hambat Bakteri	Area yang terbentuk di sekitar disk yang diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan sentimeter.	Diameter dalam Sentimeter	Interval
3	Konsentrasi Hambat Minimal	Konsentrasi terendah fraksi etil asetat daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan <i>Streptococcus pyogenes</i> yang dilakukan dengan metode dilusi dan konfirmasi dengan metode <i>streak</i> .	Konsentrasi dalam persen (%)	Interval
4	Konsentrasi Bunuh Minimal	Konsentrasi terendah fraksi etil asetat daun sirsak dalam membunuh <i>Streptococcus pyogenes</i> secara keseluruhan dilakukan dengan metode dilusi dan konfirmasi dengan metode <i>streak</i> .	Konsentrasi dalam persen (%)	Interval
5	Fraksi etil asetat daun sirsak	Fraksi yang didapat melalui teknik maserasi dan fraksinasi yang di tambah dengan pelarut <i>acetone</i> .	Konsentrasi dalam persen (%)	Interval
6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bakteri gram (+) bersifat beta-hemolitik dan sensitif terhadap <i>bacitracin</i> yang telah dikembangkan oleh STIKES Achmad Yani.	Jumlah bakteri yang disesuaikan dalam Mc Farland 0,5	Interval

3.2.2.2 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penetapan besar sampel pada penelitian ini dengan menggunakan Rumus

Frederer, yakni:

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

Keterangan: r: jumlah 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 perhitungan, maka didapatkan 4 ulangan tiap perlakuan.

Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 4 kali pengulangan dengan 6 perlakuan sehingga total sampel $4 \times 6 = 24$ sampel.

3.2.3 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan pada penelitian yaitu pemberian fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dengan metode difusi modifikasi Kirby-Bauer untuk mengetahui efektivitas hasil fraksi etil asetat daun sirsak sebagai antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*. Fraksi etil asetat daun sirsak selanjutnya dilakukan uji konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) terhadap *Streptococcus pyogenes* yang

dikonfirmasi dengan metode *streak* untuk melihat sifat kerja antibiotik (apakah bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal).

3.2.3.1 Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak

Pada penelitian ini, fraksi etil asetat daun sirsak yang digunakan adalah fraksi etil asetat yang dikembangkan oleh Fakultas Kedokteran Unisba dan Fakultas MIPA Unpad. Prosedur pembuatan fraksi dilakukan berdasarkan prosedur kerja yang ditetapkan oleh Laboratorium Kimia Unpad.

3.2.3.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

- 1) Bakteri diremajakan dari satu koloni yang sama.
- 2) Ambil bakteri dari biakan dengan ose.
- 3) Campurkan bakteri dengan larutan salin.
- 4) Kekeruhan disesuaikan dengan standar turbiditas 0,5.

3.2.3.3 Pembuatan Kultur *Streptococcus pyogenes*

- 1) Tuangkan TSA blood agar (*Trypticase soy agar* ditambah 5% darah kambing) cair ke dalam cawan sebanyak 19 ml, sampai tinggi agar 4 mm.
- 2) Lakukan homogenisasi dengan cara menggoyangkan cawan.
- 3) Tutup cawan dan diamkan sampai mengeras.
- 4) Suspensi bakteri dituangkan diatas cawan petri sebanyak 1 ml.

3.2.3.4 Prosedur Uji Biokimia Bakteri

3.2.3.4.1 Uji Katalase Bakteri

- 1) Ambil bakteri menggunakan ose, lalu tuangan ke dalam *glass slide*.
- 2) Teteskan 3% dari H₂O₂ ke *slide* lalu campurkan.

- 3) Hasilnya akan negatif, dimana tidak akan terbentuk gelembung pada *glass slide*.

3.2.3.4.2 Uji Hemolisis

- 1) Ambil bakteri dengan menggunakan ose.
- 2) *Streak* bakteri ke *blood agar*.
- 3) Diamkan selama 18- 24 jam pada suhu 35-37 °C.
- 4) Lihat zona hemolitik pada *blood agar*, dimana akan terlihat daerah yang berwarna bening di sekitar koloni bakteri.

3.2.3.4.3 Uji tes *Bacitracin*

- 1) Ambil bakteri dengan menggunakan ose
- 2) *Streak* bakteri pada *blood agar*
- 3) Tempelkan *bacitracin disc* dengan menggunakan pinset hingga kontak dengan permukaan agar
- 4) Diamkan selama 18-24 jam pada suhu 35-37 °C
- 5) Lihat zona inhibisi yang terjadi, dimana akan terdapat zona inhibisi di sekitar *bacitracin disc*.

3.2.3.5 Prosedur Uji Sensitivitas Antibiotik

Uji sensitivitas antibakteri fraksi etil asetat daun sirsak dilakukan dengan menggunakan media *blood agar* yang mengandung fraksi etil asetat daun sirsak dengan variasi konsentrasi yang berbeda yaitu 80%, 60%, 40%, 20%, 0% (kontrol negatif), dan *Bacitracin* (sebagai kontrol positif)

3.2.3.5.1 Kelompok Perlakuan Biakan *Streptococcus pyogenes*

- 1) Kelompok I : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* tanpa fraksi etil asetat daun sirsak.
- 2) Kelompok II : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* + fraksi etil asetat daun sirsak 80%.
- 3) Kelompok III : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* + fraksi etil asetat daun sirsak 60%.
- 4) Kelompok IV : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* + fraksi etil asetat daun sirsak 40%.
- 5) Kelompok V : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* + fraksi etil asetat daun sirsak 20%.
- 6) Kelompok VI : Biakan *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar* + *Bacitracin* sebagai kontrol positif.

3.2.3.5.2 Prosedur Pengukuran Zona Hambat Bakteri Metode Difusi Agar Modifikasi Kirby-Bauer

A) Persiapan Reagen

A.1) Persiapan TSA Blood Agar

Persiapan dari *TSA Blood Agar* sesuai dengan prosedur yang telah dilakukan oleh Laboratorium Mikrobiologi STIKES Achmad Yani

A.2) Persiapan Antibiotik

Pada penelitian ini digunakan antibiotik *Bacitracin* sebagai kontrol positif, dengan konsentrasi 0,04 U dalam bentuk *disc*.

A.3) Persiapan *Dried Filter Paper Disc*

Alat yang digunakan adalah *Whatman filter paper* nomor 1 dengan diameter 5 mm yang diletakkan pada cawan petri dan disterilisasikan dalam oven uap panas (*hot air oven*). Kawat dengan ukuran 20 G digunakan untuk meletakkan antibakteri ke masing-masing cakram.

A.4) Persiapan Suspensi Inokulum

Persiapan inokulum untuk tes difusi agar yang digunakan sesuai dengan metode pertumbuhan. Tiga sampai lima koloni dari isolat *Streptococcus pyogenes* diambil dengan menggunakan ose dimasukkan ke dalam tabung berisi *broth medium* yang sesuai sebanyak 4 sampai 5 ml. Kultur Broth tersebut diinkubasi pada suhu 35°C dan kekeruhannya disesuaikan dengan standar turbiditas 0,5 yang artinya dalam 1ml suspensi mengandung 1×10^8 bakteri.

B) Prosedur Pengujian Antibakteri

B.1) Prosedur Inokulasi Pelat Uji

- 1) Setelah mengatur turbiditas dari suspensi inokulum *Streptococcus pyogenes* selama 15 menit, sebuah *cotton swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi tersebut. *Cotton swab* kemudian diputar beberapa kali dengan sedikit tekanan pada dinding bagian dalam tabung di atas rata air untuk mengeluarkan inokulum berlebih dari *cotton swab*.

- 2) Inokulasi dilakukan dengan menggosokkan *cotton swab* ke seluruh permukaan agar *TSA Blood Agar*. Prosedur ini diulangi dengan menggosokkan 2 kali atau lebih mengelilingi seluruh permukaan agar.

B.2) Aplikasi Cakram Pelat Agar Uji

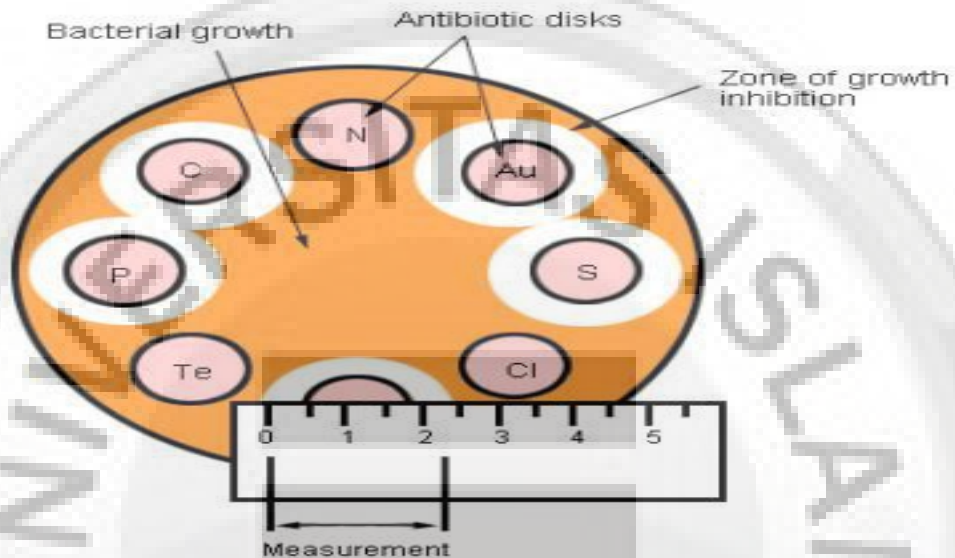
- 1) Cakram diletakkan di atas pelat agar yang telah diinokulasi. Tiap cakram harus ditekan agar memastikan kontak dengan permukaan agar secara keseluruhan. Jarak pusat cakram satu dengan lainnya tidak boleh kurang dari 24 mm.
- 2) Pelat kemudian dibalik dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 35°C selama 15 menit setelah cakram dipasang.
- 3) Antibakteri yang digunakan pada setiap cakram adalah fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan konsentrasi 80%, 60%, 40%, 20%, dan 0% serta *Bacitracin* sebagai (kontrol positif).

B.3) Pembacaan Pelat Uji dan Interpretasi Hasil

- 1) Setelah diinkubasi, setiap pelat dievaluasi. Apabila prosedur penggosokan dan inokulum sesuai maka zona inhibisi akan muncul sebagai area sirkuler dan koloni akan tumbuh berkelompok. Jika bentuk koloni yang tumbuh berupa koloni tunggal yang terpisah maka harus diulang.
- 2) Diameter dari zona hambat harus diamati dan diukur termasuk diameter cakram. Zona hambat diukur sampai milimeter terdekat menggunakan jangka sorong. Cawan petri diamati

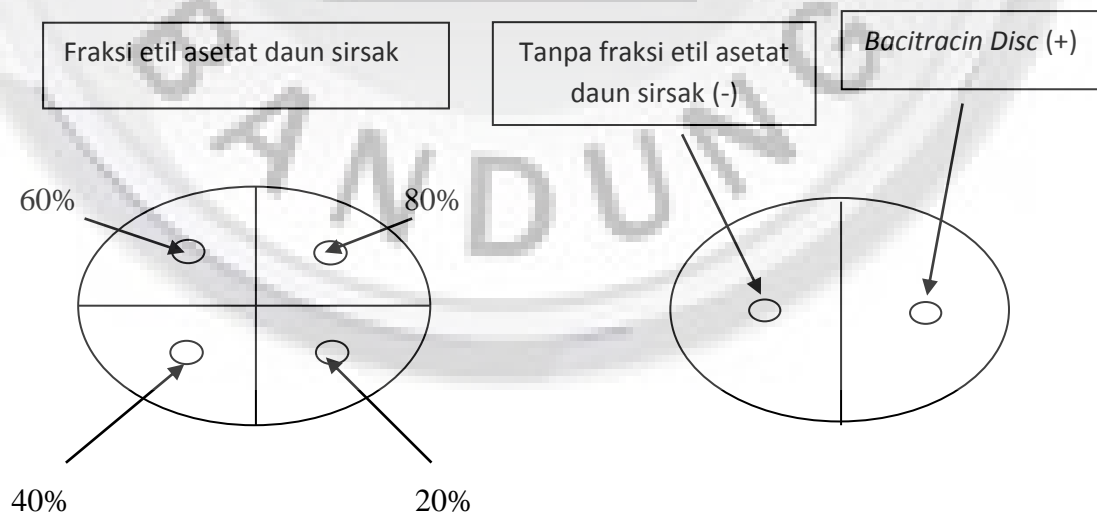
diatas latar berwarna gelap dan tidak mengkilap serta disinari dengan sedikit cahaya.

- 3) Zona hambat adalah suatu area bening dimana tidak terlihat pertumbuhan dari bakteri.



Gambar 3.1. Pengukuran zona hambat bakteri.

Dikutip dari : Street.Mrdscape 2012³⁹



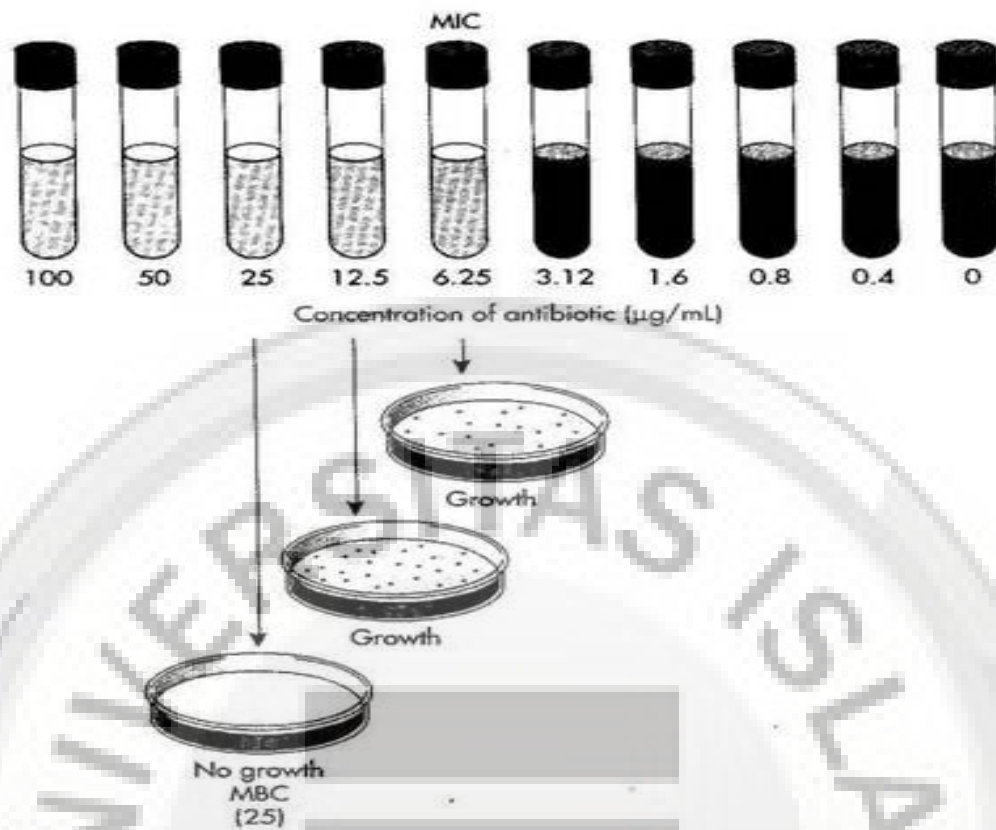
Gambar 3.2 Uji antibakteri difusi agar modifikasi Kirby-Bauer pada cawan petri

3.2.3.5.3 Prosedur Kerja Uji Hambat Minimal Metode Broth Mikrodilusi

- 1) Sebanyak 1 ml *tripticase soy broth* (TSB) dituangkan kedalam tabung.
- 2) Kemudian sterilisasi tabung yang telah terisi TSB.
- 3) Tuangkan fraksi etil asetat daun sirsak konsentrasi terkecil yang memiliki zona hambat dengan perbedaan bermakna.
- 4) Masukkan suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar McFarland 0,5 dengan volume 50 μ L.
- 5) Inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Lihat kekeruhan pada tabung pada tiap konsentrasi (metode *broth* mikrodilusi).
- 7) Baca hasil konsentrasi hambat minimal (KHM)
- 8) Dinyatakan konsentrasi hambat minimal (KHM) jika konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (tidak keruh).

3.2.3.5.4 Prosedur Uji Konsentrasi Bunuh Minimal Metode Broth Mikrodilusi

- 1) Ambil 50 μ L suspensi dari setiap tabung KHM lalu goreskan (*streak*) pada cawan petri mengandung *sheep blood agar* atau media lain yang sesuai.
- 2) Inkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.
- 3) Jumlah koloni yang tumbuh dihitung. Konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai KBM.



Gambar 3.3 Uji KHM dan KBM Bakteri

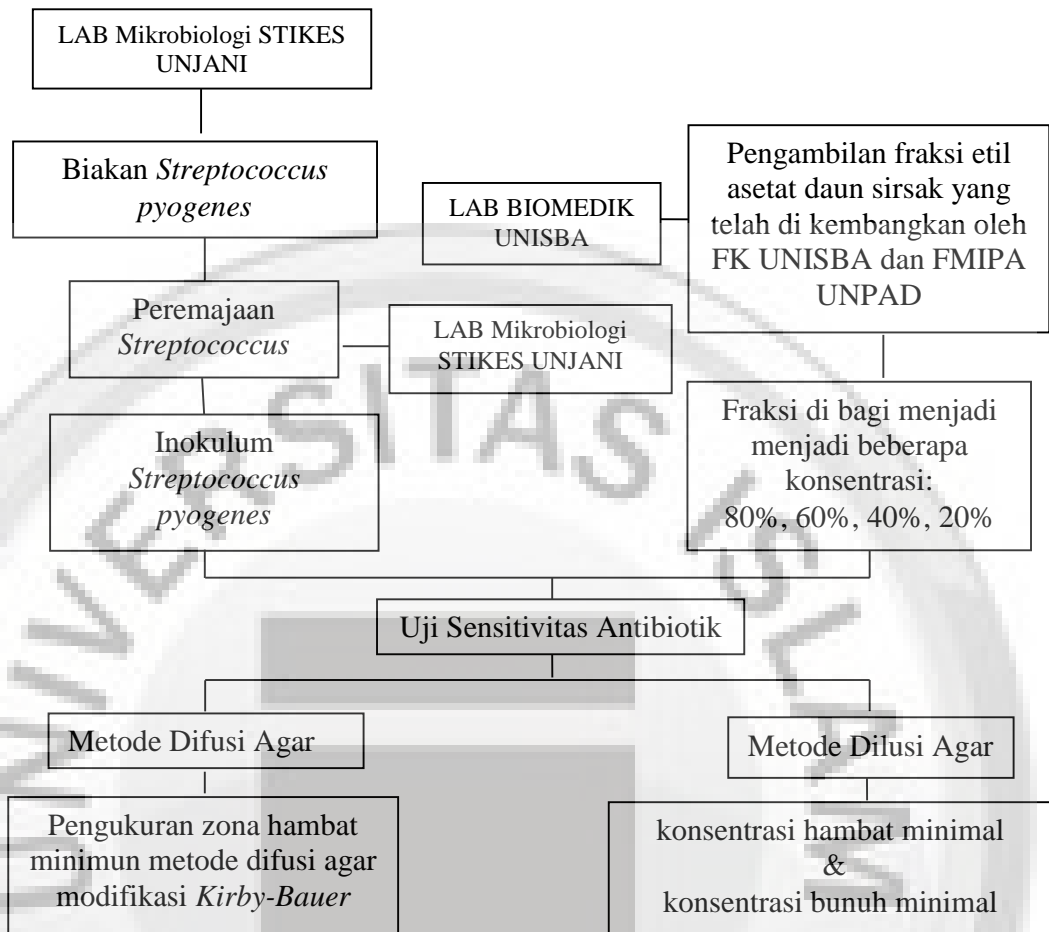
Dikutip dari : A. Taskova, Resistance *Salmonella thypirum* to ethanol based hand sanitizer⁴⁰

3.2.3.5.5 Prosedur Uji Biokimia Bakteri

- 1) Sebanyak 1 ml *tripticase soy broth* (TSB) dituangkan kedalam tabung.
- 2) Kemudian sterilisasi tabung yang telah terisi TSB.
- 3) Tuangkan fraksi etil asetat daun sirsak konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%
- 4) Masukkan suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar Mc. Farland 0,5 dengan volume 50 µL.
- 5) Inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Ambil bakteri dengan menggunakan ose
- 7) *Streak* bakteri ke *blood agar*

- 8) Diamkan selama 18- 24 jam pada suhu 35-37 °C
- 9) Lihat zona hemolitik pada *blood agar*, dan perubahan warna media yang terjadi





Gambar 3.4 Skema Alur Penelitian

3.2.4 Analisis Data

Data diperoleh dari pengukuran zona hambat bakteri dengan menggunakan jangka sorong, dilakukan adalah uji normalitas dengan *Shapiro Wilk Test* untuk melihat data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Jika dari test tersebut menunjukkan bahwa data terdistribusi normal maka langkah selanjutnya adalah melakukan uji parametrik untuk menganalisis data dengan ANOVA (*Analysis of Varian*). Apabila tes tersebut didapatkan hasil yang bermakna, maka uji statistik

dapat dilanjutkan dengan menggunakan *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok yang paling bermakna dan dilakukan perbandingan diantara kelompok tersebut. Analisis data dilakukan dengan bantuan perangkat lunak berupa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*)

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Tabel 3.2 Waktu dan Tempat

No.	Penelitian	2015			2016				
		Des	Jan	Feb	Mar	April	Mei	Juni	Juli
1	Penentuan judul								
2	Pencarian kepustakaan dan penyusunan proposal usulan penelitian								
3	Revisi proposal usulan penelitian								
4	Sidang usulan penelitian								
5	Pengambilan fraksi etil asetat daun sirsak yang telah dikembangkan oleh FK UNISBA dan FMIPA UNPAD								
6	Mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan								
7	Peremajaan <i>Streptococcus pyogenes</i> dengan metode kultur di STIKES UNJANI								
8	Memberikan perlakuan terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i> dengan fraksi etil asetat daun sirsak yang dibagi menjadi beberapa konsentrasi di STIKES UNJANI								
9	Menganalisis hasil yang diperoleh serta membuat pembahasan, simpulan, dan saran								
10	Sidang skripsi dan publikasi								

3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Objek penelitian ini menggunakan bahan biologi tersimpan (BBT), maka dalam pelaksanaan digunakan etika penelitian yaitu:

1. Pra-Penelitian
 - a. Pengambilan Bakteri

(1) Pengambilan bakteri diambil dari Badan Pengawasan Penggunaan Obat dan Makanan (BPPOM).

(2) Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang sudah disubkultur dan dikembangkan oleh BPPOM. Bakteri sudah terjamin spesifisitas bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri yang bersangkutan.

b. Pembiakan Bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi STIKES Jendral Achmad Yani dengan prosedur kultur yang telah ditetapkan di laboratorium tersebut.

2. Penelitian

a. Lokasi

Penelitian dilakukan di laboratorium STIKES Jendral Achmad Yani dengan *biosafety level 2* yaitu untuk menangani bakteri patogen penyebab penyakit.

b. Keamanan (*safety*)

(1) *Chemical Safety*

Laboratorium memiliki standar termasuk buku panduan, bahan kimia yang sudah di label dan keamanan alat-alat laboratorium.

(2) *Fire safety*

Laboratorium memiliki akses evakuasi jika terjadi kebakaran. Akses evakuasi harus mudah ditemukan dan dilewati ketika terjadi kebakaran.

(3) Electrical Safety

Energi listrik harus memenuhi keamanan dan diperiksa setiap tahunnya.

(4) Biosafety

Setiap individu yang mengerjakan harus terhindar dari infeksi yang diakibatkan oleh objek penelitian. Dilakukan dengan cara tidak menggaruk mata dan hidung ketika pengerjaan, tidak mendekatkan alat apapun ke mulut, dan hindari tertusuk oleh alat-alat yang infeksius.

c. Pengendalian (*control*)

(1) *Control Plan*

Penanggungjawab dari laboratorium sudah memastikan *exposure control* seperti pengetahuan laboran, pembuangan sisa penelitian, *standard precaution*, *personal equipment*, pengerjaan yang aman, dan *post-exposure plan*.

(2) *Engineering Control*

- *Laboratory environment*

Sirkulasi udara harus baik, laboratorium memiliki kulkas, *centrifuges*, *incubator* untuk memproses objek penelitian, serta memisahkan bahan-bahan yang bahaya rendah dan bahaya tinggi.

- *Biological safety cabinet (BSC)*

Pengerjaan prosedur penelitian dilakukan di BSC atau *laminar air flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

- *Personal Protective Equipment*

peneliti menggunakan jas laboatorium, baju khusus, sarung tangan, masker, kaca mata pelindung.

- *Post-exposure control*

Setelah pengerjaan, peneliti harus melaporkan kejadian atau kecelakaan yang terjadi saat penelitian kepada penanggungjawab dan segera mungkin melakukan pemeriksaan diri.

3. Post-Penelitian

a. Pemusnahan

Pemusnahan dilakukan bertujuan untuk membunuh bakteri yang dapat menyebabkan penyakit serta memusnahkan peralatan yang dapat menularkan penyakit. Prosedur tersebut dilakukan dengan cara insinerasi yaitu dengan cara membakar pada suhu 870-980°C hingga menjadi abu.