

BAB III

OBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan, Alat dan Objek Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Bakteri *Salmonella typhi* yang dibiakan di Laboratorium Poltekkes Bandung.
2. Habbatussauda yang diperoleh dari PD. Berkas Baru Solo dan akan dilakukan determinasi dan di ekstrak di Laboratorium Poltekkes Bandung.
3. Antibiotik siprofloksasin sebagai control positif yang didapat dari Laboratorium Poltekkes Bandung.

3.1.2 Alat Penelitian

1. Inkubator
2. Cawan petri
3. Tabung Erlenmeyer
4. Jarum ose
5. Tabung Reaksi
6. Masker
7. *Hand gloves*
8. Pipet hisap
9. Bunsen burner

10. Cotton swab
11. *Rotatory evaporator*
12. *Autoklaf*
13. Timbangan
14. Gelas ukur
15. *Hotplate*
16. *Water bath*
17. *glass spreader*

3.1.3 Objek Penelitian

Penelitian ini menggunakan objek bakteri *Salmonella typhi* yang dibiakan di Laboratorium Poltekkes Bandung.

- Kriteria inklusi: bakteri *Salmonella Typhi* yang dibiakan di Laboratorium Poltekkes Bandung.
- Kriteria eksklusi: biakan bakteri *Salmonella Typhi* yang terkontaminasi.

3.2 Jumlah Pengulangan

Penghitungan sampel menggunakan Rumus Frederer, yaitu:

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

Keterangan: r: jumlah sampel

t: jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan didapatkan 4 kali pengulangan tiap perlakuan rincian perlakuan 100%, 50%, 25%, 12.5%, kontrol negatif dan kontrol positif.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik.

3.3.2 Variabel Penelitian

a. Variable bebas:

Konsentrasi ekstrak etanol habbatussauda/biji jintan hitam.

b. Variable terikat:

- Diameter zona bening pada saat dilakukan metode difusi.
- Kekeruhan pada saat dilakukan metode dilusi untuk mengukur KHM.
- Jumlah koloni yang tersisa saat dilakukan metode dilusi untuk mengukur KBM.

c. Variable Terkendali

Lamanya waktu inkubasi, suhu inkubasi, kontrol kontaminasi bakteri dan media pertumbuhan.

3.3.3 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur	Skala
1.	Konsentrasi bunuh minimal	Konsentrasi ekstrak etanol habbatussauda minimal yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri <i>Salmonella typhi</i> dengan metode dilusi.	Konsentrasi dalam persen (%)	ordinal
2.	Konsentrasi hambat minimal	Konsentrasi ekstrak etanol habbatussauda minimal yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri <i>Salmonella typhi</i> dengan metode dilusi.	Konsentrasi dalam persen (%)	Ordinal
3.	Ekstrak etanol habbatussauda	Ekstrak yang didapat melalui teknik maserasi dan di tambah dengan pelarut etanol.	Konsentrasi dalam persen (%)	Interval

3.3.4 Prosedur Penelitian

3.3.4.1 Pembuatan Ekstrak

Penelitian ini menggunakan habbatussauda/biji jintan hitam sebagai bahan penelitian lalu diekstrak dengan etanol di Laboratorium Politeknik Kesehatan Bandung dengan metode maserasi. Dengan cara:

1. Habbatussauda dibersihkan.
2. Setelah itu dikeringkan selama 3 hari.
3. Setelah kering habbatussauda dihaluskan dengan mesin penggiling sampai menjadi bubuk kasar.
4. Bubuk kasar dari habbatussauda ditambahkan pelarut etanol 70% kemudian digoyangkan selama 1 jam hingga homogen menggunakan *shaker water bath*.
5. Selanjutnya dimaserasi selama 3 hari.
6. Lalu disaring menggunakan penyaring *Buchner*.
7. Setelah itu dipekatkan menggunakan *rotary vakum evaporator*.

3.3.4.2 Persiapan Cakram

Menggunakan kertas cakram dengan ukuran 5 mm lalu dicelupkan kedalam hasil ekstrak etanol habbatussauda 100%, dan antibiotik siprofloksasin lalu tempatkan diatas media agar Mueller-hinton yang telah diinokulasi.

3.3.4.3 Persiapan Suspensi Bakteri

1. Bakteri *salmonella typhi* dibiakan terlebih dahulu di media agar.
2. Lalu ambil bakteri dari biakan menggunakan oase kemudian campurkan koloni bakteri dengan larutan saline untuk dibuat suspensi sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland 0,5.

3.3.4.4 Persiapan Agar Mueller-Hinton

1. Setelah cairan agar Mueller-Hinton jadi sterilkan menggunakan autoklaf lalu dinginkan menggunakan *water bath* sampai suhu 50°C
2. Lalu tuangkan ke dalam cawan petri sampai tinggi agar 4 mm. Untuk cawan dengan ukuran diameter 10 cm membutuhkan Mueller-Hinton agar cair sebanyak 20-30 ml. Usahakan *tinggi* agar jangan melebihi 4 mm karena dapat menyebabkan *false-resistance result*.
3. Kemudian goyangkan cawan petri agar homogen.
4. Cawan ditutup dan diamkan sampai mengeras dan jangan sampai lid jar terbuka karena dapat menyebabkan kontaminasi⁹.

3.3.4.5 Prosedur Uji Sensitivitas Metode Difusi

1. Ambil 1 mL suspensi inokulum *Salmonella typhi* menggunakan pipet hisap. Teteskan di atas media, kemudian ratakan dengan menggunakan *glass spreader*.
2. Buat 4 daerah pada media, untuk penempatan cakram.
3. Letakkan kertas cakram (*Antimicrobial disc*) di atas permukaan media dengan menggunakan pinset steril dan sedikit ditekan, untuk memastikan kontak dengan permukaan media agar secara keseluruhan.
4. Masukkan cawan petri ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam sampai muncul zona hambat.

Uji aktivitas bakteri pada masing-masing pelarut dilakukan pengulangan sebanyak sembilan kali. Diameter zona hambat harus diukur termasuk diameter kertas cakram menggunakan jangka sorong. Interpretasi:

- Sensitif (S): diameter zona bening lebih lebar atau sama dengan kontrol positif
- Intermediate (I): diameter zona bening lebih kecil dari kontrol positif minimal 3mm
- Resisten (R): tidak terbentuk zona bening

3.3.4.6 Prosedur Uji Sensitivitas Konsentrasi Hambat Minimum Dilusi

1. NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam 6 tabung reaksi.
2. Tambahkan ekstrak etanol habbatussauda 100% ke tabung I lalu homogenkan.
3. Ambil 1 ml larutan dari tabung I kemudian masukkan ke tabung II dan homogenkan.
4. Ambil 1 ml larutan dari tabung II kemudian masukkan ke tabung III dan homogenkan.
5. Ambil 1 ml larutan dari tabung III kemudian masukkan ke tabung IV dan homogenkan.
6. Masukkan 1 ml suspensi bakteri dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 ke tabung I sampai VI.
7. Pada tabung ke V hanya dimasukkan 1 ml suspensi bakteri dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 dan 1 ml NaCl fisiologis 0,9% sebagai kontrol negatif.
8. Sedangkan pada tabung ke VI dimasukkan 1 ml suspensi bakteri dengan standar kekeruhan McFarland 0,5 dan 1 ml antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif.
9. Inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
10. Amati kekeruhan pada masing-masing tabung.
11. Baca hasil konsentrasi hambat minimal (KHM).
12. Dinyatakan konsentrasi hambat minimal (KHM) jika tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri dengan cara menilai

kekeruhan jika tidak keruh maka tidak ada pertumbuhan bakteri.

3.3.4.7 Prosedur Uji Sensitivitas Konsentrasi Bunuh Minimum Dilusi

1. Ambil suspensi dari setiap tabung KHM dengan menggunakan ose lalu goreskan (streak) pada Mueller-Hinton agar.
2. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.
3. Konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri pada agar Mueller-Hinton dinyatakan sebagai KBM.

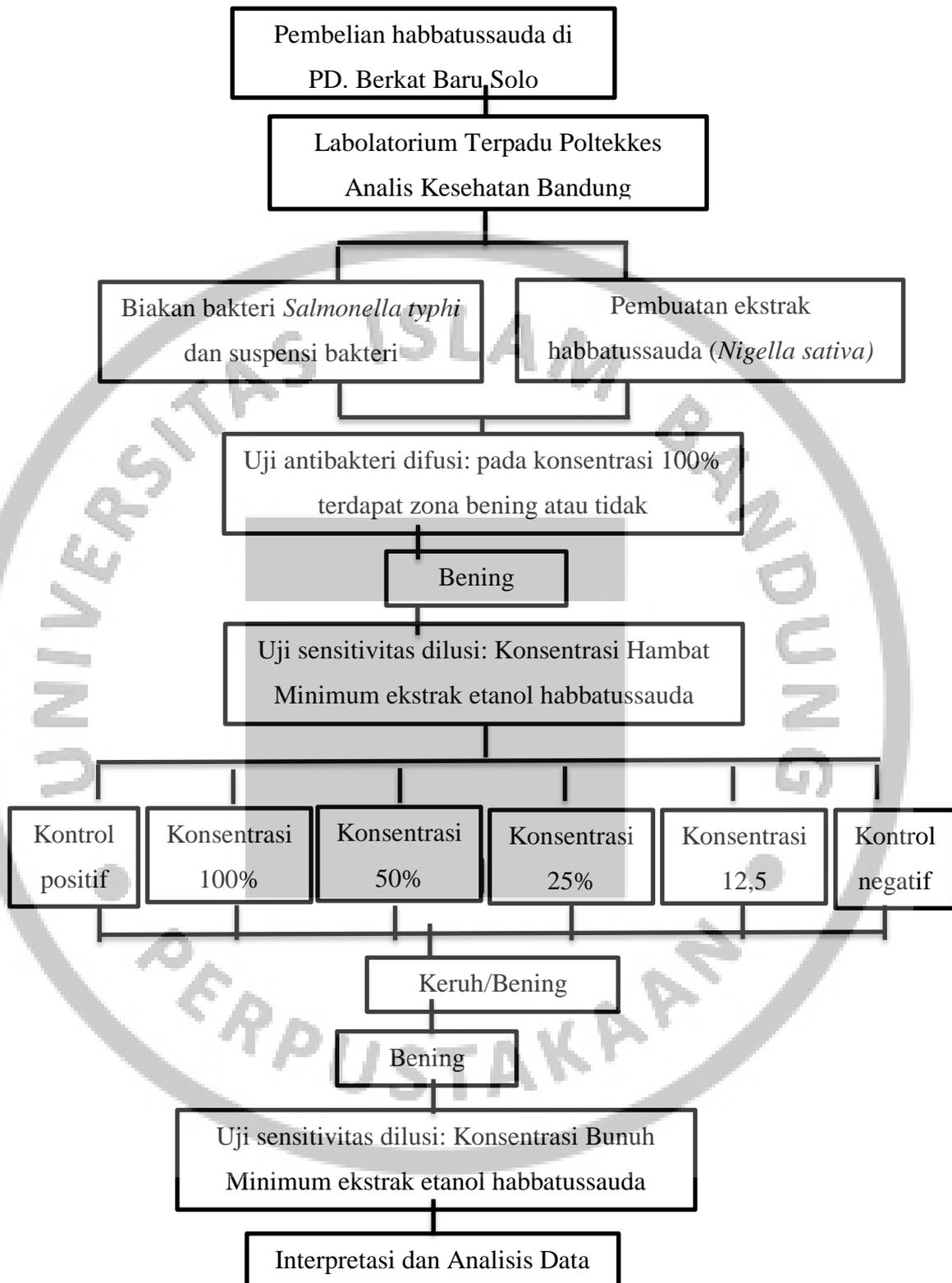
3.3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan observasi dan tes. Observasi ini merupakan metode pengumpulan data yang dilakukan dengan cara pengamatan secara langsung. Peneliti melakukan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap objek yang diteliti. Selain itu, penelitian ini juga menggunakan tes sebagai teknik pengumpulan data, yang dilakukan melalui pengukuran dan pengujian.

3.3.6 Teknik Penyajian Data

Teknik penyajian data hasil penelitian menggunakan tabel.

3.3.7 Skema Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

3.3.8 Tempat dan Waktu Penelitian

Tabel 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

No	penelitian	2018 Des	2019												2020 DES	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1.	Penentuan judul															
2.	Penyusunan proposal usulan penelitian															
3.	Revisi proposal usulan penelitian															
4.	Siding usulan penelitian															
5.	Pembelian habbatussauda di PD. Berkat Baru Solo															
6.	Pembuatan ekstrak etanol habbatussauda di Labolatorium Terpadu Poltekkes Kesehatan Bandung															
7.	Pengambilan bakteri dan uji sensitivitas KHM, KBM ekstrak etanol habbatussauda terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i> di Labolatorium Terpadu Poltekkes Kesehatan Bandung															
8.	Menganalisis hasil yang diperoleh serta membuat pembahasan, simpulan dan saran															
9.	Sidang skripsi dan publikasi															

3.3.9 Aspek etik

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 Politeknik Kesehatan Bandung.
- 2) Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang sudah disubkultur dan dikembangkan oleh Poltekes Bandung. Bakteri sudah terjamin spesifisitas bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri yang bersangkutan.

b. Pembiakan Bakteri

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

2. Penelitian

a. Lokasi

Penelitian dilakukan di laboratorium Poltekes Bandung 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 laboratorium, 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 mensterilkan peralatan yang dapat menularkan penyakit. Prosedur tersebut dilakukan dengan otoklaf