

BAB III

OBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Objek Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa yang diolah menjadi ekstrak aquades buah kurma Ajwa di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Bandung.

3.1.2 Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Bandung.

3.1.3 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah semua jenis buah kurma yang tumbuh di Madinah, Saudi Arabia.

3.1.4 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah :

1. Buah kurma yang dipilih adalah buah kurma varietas Ajwa (Merek “*Premium Dates*”) termasuk jenis *tamr* (kurma kering) yang langsung diimpor dari Madinnah, Saudi Arabia.

2. Biakan *Staphylococcus aureus* yang tumbuh sesuai kurva pertumbuhan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Bandung.

3.1.5 Kriteria Eksklusi

Kriteria Eksklusi pada penelitian ini adalah :

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang terkontaminasi.

3.1.6 Teknik Pengambilan Sampel dan Jumlah Pengulangan

Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *random*, kelompok perlakuan pada penelitian ini terdiri dari 6 perlakuan, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% untuk ekstrak dengan pelarut aquades, serta terdapat kontrol positif dan kontrol negatif. Besar sampel dan jumlah pengulangan dapat dihitung dengan menggunakan Rumus *Federer*, yaitu :⁴¹

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan :

r = Jumlah sampel (pengulangan)

t = Banyaknya kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, besar sampel (pengulangan) yang dilakukan pada penelitian ini adalah 4 kali. Dari hasil tersebut, maka jumlah keseluruhan sampel yang digunakan sebanyak $4 \times 6 = 24$ sampel.

3.1.7 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Pelarut aquades
2. Pelarut *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO 100%)
3. Erythromycin 15 mcg
4. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
5. Media *Mueller Hinton Broth* (MHB)
6. NaCl fisiologis 0,9%
7. H₂SO₄ 1%
8. BaCl₂ 1%
9. Biakan *Staphylococcus aureus*

3.1.8 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Oven
2. Autoklaf
3. Inkubator
4. *Laminar Air Flow (LAF) Cabinet*
5. Cawan petri

6. Mikropipet 10-50 μ l, 100-1000 μ l
7. Jarum ose
8. Pengaduk
9. Pipet tetes
10. Gelas beker
11. Gelas ukur
12. Tabung *Erlenmeyer*
13. Aluminium foil
14. Kertas Cakram
15. Penggaris atau jangka sorong
16. Rak tabung
17. Timbangan
18. *Hand gloves*
19. Masker
20. *Cork bore*

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian⁴²

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental secara *in vitro* yang termasuk jenis penelitian *true experimental design*, dengan menggunakan *Posttest Only Control Group Design*. Jenis rancangan ini adalah memilih kelompok penelitian secara random yang terdiri dari kelompok konsentrasi 100%, konsentrasi 50%, konsentrasi 25%, konsentrasi 12,5%, kelompok kontrol positif, dan kontrol negatif. Baik kelompok perlakuan maupun

kelompok kontrol, setelah dilakukan pemilihan, kelompok perlakuan diberikan intervensi, sedangkan kelompok kontrol tidak. Kemudian diukur dan dilakukan *posttest* untuk membandingkan kedua kelompok. Metode uji yang digunakan adalah pemberian ekstrak aquades buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa terhadap biakan *Staphylococcus aureus*.

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak aquades buah kurma varietas Ajwa.
2. Variabel terikat : Zona hambat pada biakan *Staphylococcus aureus* yang diberi ekstrak aquades buah kurma varietas Ajwa, nilai konsentrasi hambat minimum, dan nilai konsentrasi bunuh minimum.
3. Variabel terkontrol : Waktu inkubasi *Staphylococcus aureus*, medium pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, suhu inkubasi, sterilisasi alat, dan jenis buah kurma.

3.2.3 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak aquades buah kurma varietas Ajwa	Buah kurma varietas Ajwa yang dimaserasi dengan menggunakan pelarut aquades hingga didapatkan ekstraknya	Konsentrasi dalam persen	Nominal
2	Efek Antibakteri	Kemampuan suatu zat untuk menghancurkan atau menghambat pertumbuhan bakteri, yang dapat dinilai melalui penghitungan zona hambat melalui area bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram pada media kultur.	Milimeter	Nominal
3	Konsentrasi Hambat Minimum	Konsentrasi terendah yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi tabung yang diukur menggunakan metode spektrofotometri	Tingkat Kekeruhan	Ordinal
4	Konsentrasi Bunuh Minimum	Konsentrasi terendah yang diperlukan untuk membunuh 99,9% pertumbuhan bakteri dengan metode <i>drop plate</i>	CFU/mL	Nominal

3.2.4 Prosedur Penelitian

3.2.4.1 Determinasi Buah Kurma Varietas Ajwa

Determinasi buah kurma varietas Ajwa dilakukan untuk mengetahui kebenaran sampel terkait dengan ciri-ciri morfologi dan jenis buah sesuai dengan morfologi tanaman yang ada pada pustaka, yang dilakukan di Laboratorium Biologi SITH Institut Teknologi Bandung.

3.2.4.2 Pembuatan Ekstrak Aquades Buah Kurma Ajwa

Daging buah kurma Ajwa yang telah dipisahkan dari biji, dikeringkan selama 2 minggu dalam lemari pengering dengan suhu 30 °C. Daging buah kurma yang telah kering kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender. Setelah diperoleh serbuk dari daging buah kurma kering sebanyak 500 g, kemudian dimasukkan ke dalam bejana kaca dan direndam dengan aquades dengan perbandingan serbuk buah kurma kering dan pelarut 1:5, selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Setiap 24 jam, ekstrak disaring dengan menggunakan *vacuum Buchner* dan residunya dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang baru. Maserasi dilakukan pada suhu ruangan dan dibantu pengadukan. Setelah tiga hari, Maserat yang terkumpul kemudian dipekatkan menggunakan *freeze dryer* selama kurang lebih tiga hari sampai terbentuk ekstrak serbuk. Ekstrak yang dihasilkan kemudian ditimbang. Kemudian dihitung rendemennya dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100\%$$

Pada penelitian ini, Ekstrak aquades buah kurma Ajwa dilakukan di Politeknik Kesehatan Bandung dengan prosedur pembuatan ekstrak yang dilakukan berdasarkan prosedur kerja yang ditetapkan oleh Laboratorium Politeknik Kesehatan Bandung.

3.2.4.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Tahapan pembuatan suspensi bakteri pada penelitian ini dilakukan sebagai berikut :

1. Alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan cara dibungkus dengan menggunakan aluminium foil, kemudian dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.
2. Koloni bakteri ditumbuhkan terlebih dahulu pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*), sehingga dapat diremajakan pada satu koloni yang sama.
3. Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dengan menggunakan ose untuk disuspensikan dalam media MHB (*Mueller Hinton Broth*) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian disamakan konsentrasinya dengan standar McFarland 10⁸ CFU/mL dengan cara mensuspensikannya dengan larutan NaCl fisiologis hingga didapatkan kekeruhan yang sama dengan standar McFarland.

3.2.4.4 Kelompok Perlakuan Biakan *Staphylococcus aureus*

Kelompok perlakuan pada biakan *Staphylococcus aureus* pada penelitian ini adalah :

1. Kelompok I : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + ekstrak aquades buah kurma Ajwa dengan konsentrasi 100%.
2. Kelompok II : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + ekstrak aquades buah kurma Ajwa dengan konsentrasi 50%.
3. Kelompok III : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + ekstrak aquades buah kurma Ajwa dengan konsentrasi 25%.
4. Kelompok IV : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + ekstrak aquades buah kurma Ajwa dengan konsentrasi 12,5%.
5. Kelompok IX : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + eritromisin sebagai kontrol positif.
6. Kelompok X : Biakan *Staphylococcus aureus* pada media MHA + DMSO 100% sebagai kontrol negatif.

3.2.4.5 Prosedur Pengujian Antibakteri

A. Metode Sumuran

Prosedur pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode sumuran dengan media *Mueller Hinton Agar*, mencakup langkah-langkah sebagai berikut :

- Sebanyak 2 gram *Mueller Hinton Agar* dilarutkan dalam 100 mL aquades lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan menggunakan aluminium foil.
- Sterilisasi media MHA menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi, lalu didinginkan pada *waterbath* dengan suhu 45-50 °C.

- Tuangkan medium yang telah didinginkan 25-30 ml ke dalam cawan petri (diameter 10 cm) dengan dasar rata untuk menghasilkan kedalaman yang sama yaitu 4 mm. Ketika media agar sudah memadat, keringkan dengan menggunakan inkubator pada suhu 37 °C.
- Ambil 1 mL suspensi inokulum *Staphylococcus aureus* menggunakan pipet hisap. Teteskan di atas media, kemudian ratakan dengan menggunakan *glass spreader*.
- Buat 4 daerah pada media yang digunakan untuk membuat sumuran yang akan diisi oleh ekstrak aquades dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% serta buat 2 daerah pada cawan petri yang lain untuk kontrol positif dan negatif.
- Buat sumuran pada media agar dengan menggunakan *cork bore* diameter 8 mm pada masing-masing daerah sesuai dengan konsentrasi ekstrak, teteskan ekstrak ke dalam sumuran yang telah dibuat.
- 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 4 kali. Diameter zona hambat harus diukur termasuk diameter *cork bore*. Zona hambat dapat diukur dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong. Luas zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Zona hambat = Zona keseluruhan – diameter *cork bore*.

3.2.4.6 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Media yang digunakan untuk uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah media MHB (*Mueller Hinton Broth*) dengan menggunakan metode dilusi tabung atau pengenceran yaitu dengan cara penanaman bakteri pada media MHB. Selain itu, metode yang digunakan pada uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah metode *drop plate* dengan cara penanaman bakteri pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) pada cawan petri.

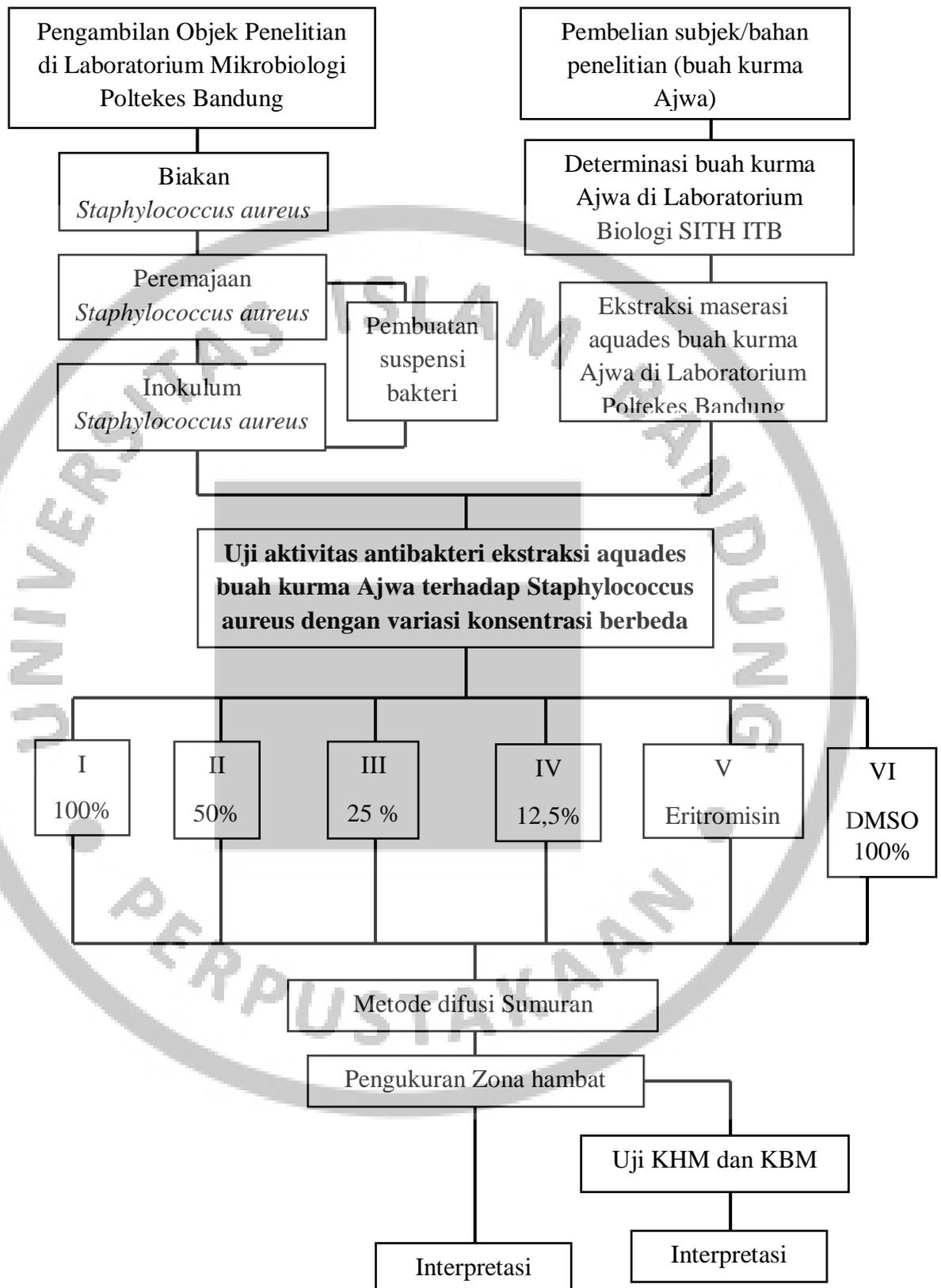
3.2.5 Teknik Pengumpulan Data

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.

3.2.6 Teknik Penyajian Data

Teknik penyajian data yang digunakan pada penelitian ini adalah penyajian matematis, yaitu penyajian data hasil penelitian dengan menggunakan angka-angka dalam bentuk tabel.

3.2.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.2.8 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara analitik komparatif numerik lebih dari dua kelompok tidak berpasangan, yang dianalisis menggunakan *software* statistik. Data akan dianalisis menggunakan uji *Shapiro Wilk*, untuk melihat data terdistribusi normal atau tidak. Kemudian dilakukan transformasi data untuk mendapatkan data yang berdistribusi normal. Jika terdapat data yang berdistribusi tidak normal, maka dilakukan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Post hoc Mann-Whitney*. Uji parametrik *One-way Anova* dan diteruskan dengan uji *Post hoc Bonferroni* digunakan apabila data terdistribusi normal.

3.2.9 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.9.1 Tempat Penelitian

Penelitian dan pembuatan ekstrak aquades buah kurma Ajwa, dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Bandung dan Laboratorium Biologi SITH Institut Teknologi Bandung.

3.2.9.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2019 sampai dengan bulan Oktober 2019.

Tabel 3.2 Waktu Penelitian

No	Kegiatan penelitian	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Sep	Okt	Nov	Des
1	Penyajian judul	■												
2	Studi literatur	■	■											
3	Penulisan dan penyusunan usulan penelitian	■	■	■										
4	Usulan Penelitian													
5	Pengambilan data													
6	Pengolahan dan analisis data													
7	Penyusunan laporan hasil penelitian													

3.2.10 Aspek Etik Penelitian

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

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.

- d. *Pemusnahan*

Pemusnahan dilakukan bertujuan untuk membunuh bakteri yang dapat menyebabkan penyakit serta memusnahkan peralatan yang dapat menularkan penyakit. Prosedur tersebut dilakukan dengan otoklaf.