

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini bersifat deskriptif analitik untuk mengetahui kadar hambat minimum enzim Lisozim, antibiotik sefadroksil, dan kombinasinya terhadap *Staphylococcus aureus* kemudian menentukan apakah kombinasi menghasilkan interaksi sinergis, aditif, indiferen, atau antagonis.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah *Staphylococcus aureus* yang telah tersedia di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY, yang kemudian diencerkan dari  $10^8$  µl/ml menjadi  $5 \times 10^6$  µl/ml. Dalam penelitian ini digunakan strain *Staphylococcus aureus* koleksi Laboratorium Mikrobiologi FK UMY. Untuk penelitian ini sebaiknya di gunakan bakteri *Staphylococcus aureus* standart (ATCC).

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian telah di lakukan pada bulan November tahun 2016, di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel terikat

Variabel terikat adalah kadar hambat minimum lisozim, sefadroksil, dan kombinasi dari lisozim dengan sefadroksil.

## 2. Variable bebas

Variabel bebas adalah konsentrasi enzim lisozim, antibiotik sefadroksil, dan kombinasi lisozim dengan sefadroksil.

## 3. Variable terkendali

Variabel terkendali adalah sterilisasi alat dan bahan, media pembiakan, suspensi bakteri, suhu inkubasi ( $37^{\circ}\text{C}$ ), dan durasi inkubasi (18-24 jam).

## 4. Variable tak terkendali

Variabel tak terkendali dalam penelitian ini adalah adanya kontaminan berupa mikroorganisme lain.

## E. Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini adalah:

1. Lisozim adalah enzim yang sudah dibersihkan dari sel yang terdapat pada organisme hidup dan beberapa macam virus (Benkerioum, 2008). Lisozim yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Universitas Airlangga Surabaya. Konsentrasi enzim lisozim yang digunakan pada penelitian ini adalah  $200\ \mu\text{g/ml}$ .
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan adalah bakteri yang sudah tersedia dan sudah melewati masa inkubasi (18-24 jam) koleksi laboratorium mikrobiologi FK UMY.

3. Sefadroksil adalah antibiotik betalaktam jenis sefalosporin, yang di digunakan pada penelitian ini di dapat dari PT. Hexpharm Jaya Laboratorium sebanyak (500 µg/ml dan 1000 µg/ml).
4. Kombinasi dari lisozim dan sefadroksil merupakan campuran dari enzim dan antibiotik yang akan di lakukan pada penelitian,
5. Kadar hambat minimum adalah kadar minimum yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhny, juga merupakan konsentrasi hambat yang menjadi dasar untuk mengetahui daya hambat obat terhadap bakteri, untuk golongan sefalosporin seperti sefadroksil itu sekitar  $\leq 18$  sampai  $\geq 32$  per µg/ml (CLSI table M100-S24, 2014).

## **F. Alat dan Bahan penelitian**

### 1. Alat Penelitian

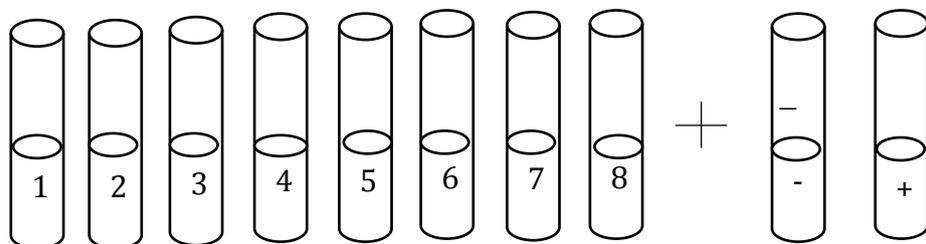
Instrumen laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: tabung reaksi kecil, tabung reaksi besar, rak tabung, loop steril, pembakar bunsen beserta spiritus, mikropipet, tip, alat pelindung diri, inkubator, pelat mikrotiter, kertas bergaris, dan tempat sampah.

### 2. Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian adalah: akuades, BHI ds, NaCl, agar darah, Lisozim, standar McFarland, dan Sefadroksil (100 mg/ml dan 200 mg/ml).

### G. Jalannya penelitian

- 1) Persiapan, berupa persiapan alat dan bahan sterilisasi semua alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian dipersiapkan terlebih dahulu.
- 2) Biakan dari sampel bakteri uji *Staphylococcus aureus* ditanam pada medium agar miring dari nutrisi agar, diinkubasi pada 37<sup>0</sup> C selama 24 jam. Diambil 1 koloni dan diinokulasi ke dalam 2 ml medium cair BHI, lalu diinkubasi selama 2-5 jam pada 37<sup>0</sup> atau sampai pertumbuhan tampak. Selanjutnya dibuat suspensi bakteri dengan cara menambahkan larutan NaCl sampai kekeruhan sama dengan standar Brown III (10<sup>8</sup> CFU/ml). Suspensi bakteri uji tersebut diencerkan lagi dengan medium cair BHI sehingga diperoleh kadar 10<sup>6</sup> CFU/ml (William, 1991).



Gambar 6 kombinasi sefadroksil-lisozim dari tabung 1 sampai tabung 8

Keterangan:

- |             |                |
|-------------|----------------|
| 1. 200µg/ml | 5. 12,5µg/ml   |
| 2. 100µg/ml | 6. 6,25µg/ml   |
| 3. 50µg/ml  | 7. 3,125µg/ml  |
| 4. 25µg/ml  | 8. 1,5625µg/ml |

- 3) Larutan antibiotik sefadroksil dibuat dengan melarutkan 100 mg serbuk sefadroksil dalam 100 ml larutan NaCl. Sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/ml. Disediakan 15 tabung volum 5 ml steril, dimasukkan 1 ml

akuades mulai tabung ke-2 sampai tabung ke-13. Selanjutnya dimasukkan pula 1 ml larutan antibiotik sefadroksil dengan konsentrasi 200 mikrogram pada tabung ke-1 dan tabung ke-2. Tabung ke-2 dicampur sampai homogen, diambil 1 ml campuran larutan tersebut dimasukkan kedalam tabung ke-3. Demikian seterusnya, sehingga diperoleh pengenceran secara serial menjadi setengah konsentrasi mula-mula. Konsentrasi awal sefadroksil kadar Bakteri dari agar darah diambil dengan loop yang telah dipanaskan kemudian bakteri dimasukkan ke dalam NaCl 7 ml. konsentrasi awal sefadroksil tabung : ke-1 200  $\mu\text{g/ml}$ , ke-2 100  $\mu\text{g/ml}$ , ke-3 50  $\mu\text{g/ml}$  dan seterusnya sampai konsentrasi terkecil.

- 4) Suspensi bakteri  $10^6$  CFU/ml yang dibuat di atas, diambil dan dimasukkan masing-masing kedalam tabung ke-1 sampai ke-10, kecuali tabung ke-10 hanya mengandung BHI tanpa bakteri sebagai kontrol negatif. Tabung ke-9 mengandung bakteri dalam medium BHI sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri.
- 5) Penentuan kadar hambat minimal dari sefadroksil yaitu melihat konsentrasi akhir sefadroksil setelah ditambah bakteri uji menjadi tabung: ke-1 100  $\mu\text{g/ml}$ , ke-2 50  $\mu\text{g/ml}$ , ke-3 25  $\mu\text{g/ml}$  dan seterusnya sampai yang terkecil. Kadar hambat minimal akan ditunjukkan dengan tidak timbulnya kekeruhan pada konsentrasi terendah atau tabung yang memperlihatkan bening pertama pada deretan tabung menunjukkan KHM dari antibiotik tadi, selanjutnya abung yang tidak menunjukkan adanya

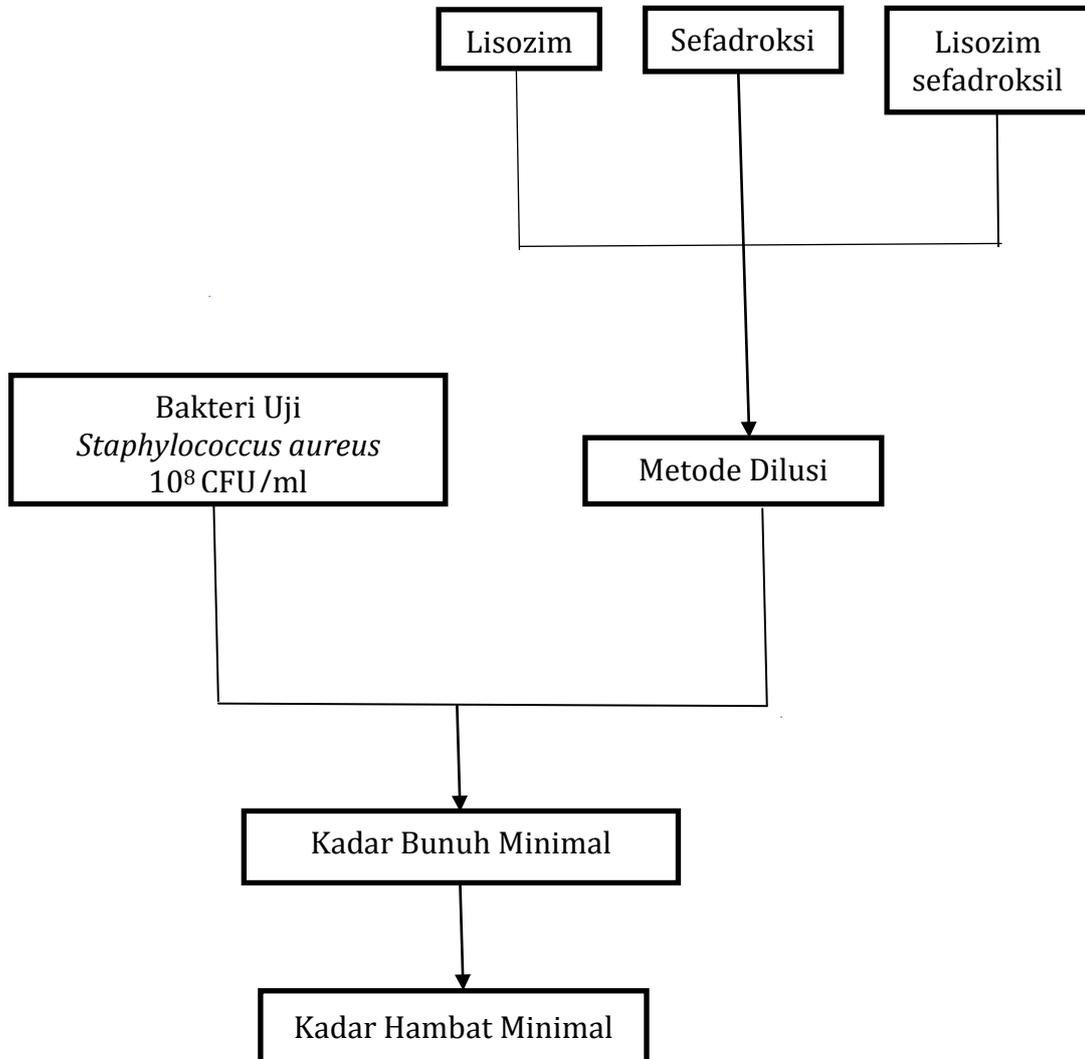
pertumbuhan bakteri, yaitu tabung yang bening selanjutnya ditanam pada media TSA, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . tabung yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri pada media TSA dengan konsentrasi tertentu menunjukkan kadar bunuh minimal.

- 6) Penentuan kadar hambat minimal dari sefadroksil yang dikombinasikan dengan lisozim dengan metode pengenceran tabung adalah membuat seri pengenceran larutan sefadroksil seperti di atas. Ke dalam masing-masing tabung dari tabung ke-1 sampai tabung ke-14, dimasukkan 1 ml suspensi lisozim (60 mg serbuk lisozim yang dilarutkan dalam 100 ml buferfosfat) dengan konsentrasi  $600\ \mu\text{g/ml}$ .
- 7) Selanjutnya untuk menentukan kadar hambat minimal kombinasi antara sefadroksil dan lisozim cara yang sama digunakan seperti pada nomor 1-6.

#### **H. Analisis Data**

Analisis data yang digunakan untuk penelitian ini adalah uji t berpasangan tapi karena uji distribusi dengan menggunakan saphiro wilk didapatkan data yang tidak normal jadi menggunakan Mann Whitney test, dilanjutkan uji distribusi F (Al-Rasyi, 1994 dalam Suryani 2000), untuk membandingkan nilai KHM sefadroksil dengan kombinasi sefadroksil dan lisozim terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

## I. Alur Penelitian



Gambar 7 Alur Penelitian