

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat Eksperimen Laboratorium untuk mengetahui kadar hambat minimum enzim lisozim, antibiotik Amoksisilin, dan kombinasinya terhadap *Streptococcus pneumoniae* resisten Amoksisilin.

B. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah *Streptococcus pneumoniae* resisten Amoksisilin yang telah didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang kemudian diencerkan dari 10^8 CFU/ml menjadi 5×10^6 CFU/ml.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Juli - Agustus 2018, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah konsentrasi enzim lisozim dan Amoksisilin.

2. Variabel tak terkendali

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

3. Variabel terkendali

Didalam penelitian ini yang merupakan variabel terkendali adalah alat, bahan, suhu inkubasi (37⁰C), durasi inkubasi (18–24 jam), strain bakteri uji dan konsentrasi bakteri uji.

4. Variabel terikat

Variabel terikat adalah kadar hambat minimum dari Amoksisilin, lizozim dan kombinasi dari lizozim dan Amoksisilin.

E. Definisi Operasional

1. *Streptococcus pneumoniae* adalah bakteri bentuk kokus, lanset, tersusun seperti rantai yang didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang berupa strain lokal dan termasuk bakteri yang resisten terhadap Amoksisilin.
2. Amoksisilin adalah antibiotik jenis β -laktam golongan dari Penisilin didapatkan dari Laboratorium Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan konsentrasi 500 μ g/ml dan 1000 μ g/ml dan berbentuk serbuk,
3. Lizozim adalah enzim yang sudah dibersihkan dari sel yang terdapat pada organisme hidup dan berbagai macam virus (Benkerioum, 2008). Lizozim yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Universitas Airlangga Surabaya dalam

bentuk kristal, produksi sigma. Konsentrasi yang digunakan untuk penelitian ini terhadap enzim lisozim yaitu 300 µg/ml.

4. Kombinasi dari lisozim dan Amoksisilin merupakan campuran dari lisozim 300 µg/ml dan Amoksisilin 500 µg/ml yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilakukan homogenisasi dengan menggunakan alat vortex portable pada saat dilakukan penelitian.
5. Kadar hambat minimum adalah konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi pada Amoksisilin 125 µg/ml, lisozim 300 µg/ml dan kombinasi 100 µg/ml.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Instrumen Laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: tabung reaksi besar, tabung reaksi kecil, mikropipet, rak tabung, pembakar bunsen beserta spiritus, alat pelindung diri, autoklaf, vortex portable dan incubator.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah BHI cair, TSA, bakteri *Streptococcus pneumoniae*, lisozim, Amoksisilin (500 mg/ml), aquades, standar McFarland, dan NaCl.

G. Jalannya Penelitian

- 1) Persiapan, berupa persiapan alat dan bahan sterilisasi semua alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian dipersiapkan terlebih dahulu.

2) Persiapan bakteri uji

- a. Biakan dari sampel bakteri uji (*Streptococcus pneumoniae*) ditanam pada media medium agar miring dari nutrient agar, di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- b. Di ambil 1 koloni bakteri dan dibuat suspensi bakteri dengan cara menambahkan larutan NaCL fisiologis steril sampai kekeruhan sama dengan standar Brown III (10^8 CFU/ml). Suspensi bakteri uji tersebut diencerkan lagi dengan medium cair BHI sehingga diperoleh kadar 10^6 CFU/ml.

3) Penentuan kadar hambat minimum Amoksisilin dengan metode pengenceran tabung.

- a. Larutan antibiotik Amoksisilin dibuat dengan melarutkan 100 mg serbuk Amoksisilin dalam 100 ml larutan aquades, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ug/ml.
- b. Disediakan 15 tabung volume 5 ml steril, dimasukkan 1 ml akuades mulai tabung ke-2 sampai tabung ke-13. Selanjutnya dimasukkan pula 1 ml larutan antibiotik Amoksisilin dengan konsentrasi 1000 ug/ml ke tabung 1, diambil 1 ml campuran larutan tersebut dimasukkan kedalam tabung ke-2. Demikian seterusnya, sehingga diperoleh pengenceran secara serial menjadi setengah konsentrasi mula-mula.
- c. Konsentrasi awal Amoksisilin tabung: ke-1 1000 ug/ml, ke-2 500 ug/ml, ke-3 250 ug/ml, ke-4 125 ug/ml, ke-5 62,5 ug/ml, ke-6 31,25 ug/ml, ke-7

15,63 ug/ml, ke-8 7,81 ug/ml, ke-9 3,91 ug/ml, ke-10 1,95 ug/ml, ke-11 0,98 ug/ml, ke-12 0,49 ug/ml, dan tabung ke-13 0,24 ug/ml.

- d. Suspensi bakteri 10^6 CFU/ml yang dibuat di atas, diambil dan dimasukkan masing-masing 1 ml ke dalam tabung ke-1 sampai ke-15, kecuali tabung ke-14 hanya mengandung BHI tanpa bakteri sebagai kontrol sterilitas bahan (kontrol negatif). Tabung ke-15 mengandung bakteri dalam medium BHI sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri.
- e. Konsentrasi akhir Amoksisilin setelah ditambah bakteri uji menjadi tabung: ke-1 500 ug/ml, ke-2 250 ug/ml, ke-3 125 ug/ml, ke-4 62,5 ug/ml, ke-5 31,25 ug/ml, ke-6 15,63 ug/ml, ke-7 7,82 ug/ml, ke-8 3,91 ug/ml, ke-9 1,96 ug/ml, ke-10 0,98 ug/ml, ke-11 0,49 ug/ml, ke-12 0,24 ug/ml, dan tabung ke-13 0,12 ug/ml.
- f. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g. Kadar hambat minimum akan ditunjukkan dengan tidak timbulnya kekeruhan pada konsentrasi terendah atau tabung yang memperlihatkan bening pertama pada deretan tabung menunjukkan KHM dari antibiotik tadi.

4) Penentuan kadar hambat minimum lisozim

- a. Larutan lisozim dibuat dengan melarutkan 60 mg serbuk kristal lisozim dalam 100 ml larutan aquades, sehingga diperoleh konsentrasi 600 ug/ml.
- b. Disediakan 15 tabung volume 5 ml steril, dimasukkan 1 ml aquades mulai tabung ke-2 sampai tabung ke-15 kecuali tabung ke-14. Selanjutnya dimasukkan pula 1 ml larutan lisozim dengan konsentrasi 300 mikrogram

pada tabung ke-1 dan ke-2 dan tabung ke-14. Demikian seterusnya, sehingga diperoleh pengenceran secara serial menjadi setengah konsentrasi mula-mula. Tabung ke-1 konsentrasinya 600 ug/ml, tabung ke-2 300 ug/ml, tabung ke-3 150 ug/ml, selanjutnya konsentrasi dibuat menjadi setengahnya.

- c. Suspensi bakteri 10^6 CFU/ml yang dibuat di atas, diambil dan dimasukkan masing-masing 1 ml ke dalam tabung ke-1 sampai ke-15, kecuali tabung ke-14 hanya mengandung BHI tanpa bakteri sebagai kontrol sterilitas bahan (kontrol negatif). Tabung ke-15 mengandung bakteri dalam medium BHI sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri.
- d. Konsentrasi akhir lisozim setelah ditambah bakteri uji menjadi tabung: ke-1 300 ug/ml, ke-2 150 ug/ml, ke-3 75 ug/ml, ke-4 37,5 ug/ml, ke-5 18,75 ug/ml, ke-6 9,38 ug/ml, ke-7 4,69 ug/ml, ke-8 2,34 ug/ml, ke-9 1,17 ug/ml, ke-10 0,59 ug/ml, ke-11 0,29 ug/ml, ke-12 0,15 ug/ml, dan tabung ke-13 0,07 ug/ml.
- e. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- f. Kadar hambat minimal akan ditunjukkan dengan tidak timbulnya kekeruhan pada konsentrasi terendah atau tabung yang memperlihatkan bening pertama pada deretan tabung menunjukkan KHM dari lisozim tadi.

5) Penentuan kadar hambat minimum lisozim dan Amoksisilin

- a. Dibuat seri pengenceran larutan Amoksisilin seperti di atas (No 3).
- b. Ke dalam masing-masing tabung dari tabung ke-1 sampai tabung ke-14, dimasukkan 1ml suspensi lisozim (60 mg serbuk lisozim yang dilarutkan dalam 100 ml aquades) dengan konsentrasi 600 mikrogram per milimeter.
- c. Suspensi bakteri 10^6 CFU/ml yang dibuat di atas, diambil dan dimasukkan masing-masing 1 ml ke dalam tabung ke-1 sampai ke-15, kecuali tabung ke-14 hanya mengandung BHI tanpa bakteri sebagai kontrol sterilitas bahan (kontrol negatif). Tabung ke-15 mengandung bakteri dalam medium BHI sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri.
- d. Konsentrasi akhir Amoksisilin setelah dikombinasikan dengan 300 ug/ml lisozim kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- e. Kadar hambat minimal akan ditunjukkan dengan tidak timbulnya kekeruhan pada konsentrasi terendah atau tabung yang memperlihatkan bening pertama pada deretan tabung menunjukkan KHM dari lisozim tadi.

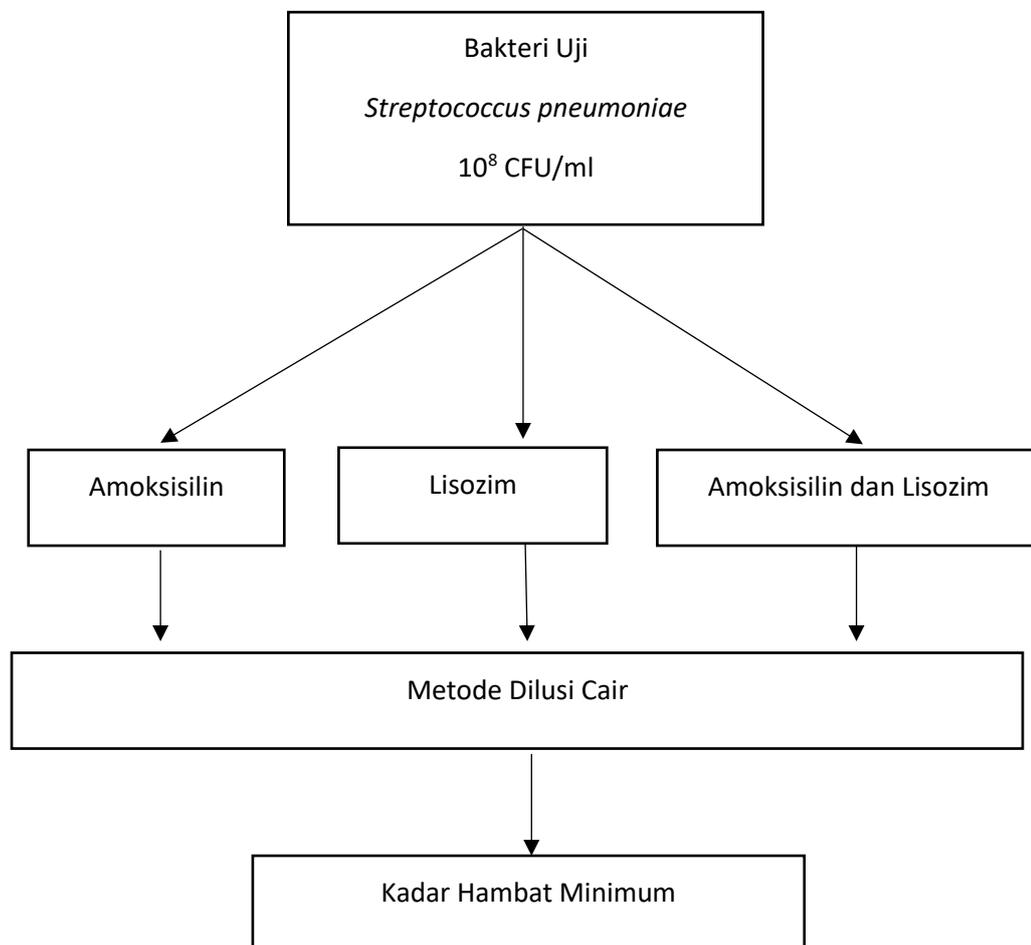
H. Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk penelitian ini adalah uji Anova, untuk membandingkan nilai KHM Amoksisilin dengan kombinasi lisozim terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae* resisten Amoksisilin.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini mendapatkan ijin persetujuan dari Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta Nomor: 339/EP-FKIK-UMY/VII/2018.

J. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian