

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian eksperimen laboratorium yaitu *pra experiment* dengan jenis penelitian *The Statistic Group Comparasion*. Dengan uji statistik *Independent sampel t test* (Uji T-tes). Desain penelitian ini dijelaskan pada Gambar 8 berikut ini.

Eksperimen	Post – test
X	O ₂
	O ₂

Gambar 8. Desain Penelitian

Keterangan :

- X : Eksperimen, yaitu bentuk perlakuan atau inovasi yang dilakukan peneliti.
- O₂ : Observasi 2 (post-test), yaitu keadaan variabel terikat sesudah diintervensi.

B. Subyek dan Obyek Penelitian

1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari biakan spesimen urin pasien yang telah diuji identifikasi bakteri kemudian dibuat suspensi bakteri dari media *Nutrient Agar* (NA) dimasukkan dalam NaCl steril dengan menggunakan perbandingan standar Mc Farland 5 yang ada di laboratorium mikrobiologi RSUD Panembahan Senopati Bantul.

2. Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah media agar *Mac Conkey* dan media agar *Muller Hinton*. Yang dibuat masing-masing sejumlah 8 (delapan) plate agar ukuran 90 x 15 mm dengan 4 (empat) *disk* antibiotik ciprofloxacin disetiap plate agar.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Panembahan Senopati Bantul sebagai tempat dilaksanakannya pembuatan media agar *Mac Conkey* dan media agar *Mueller Hinton* serta pengujian antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Waktu dilakukannya penelitian adalah pada bulan Oktober sampai November 2018.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Variabel penelitian ini meliputi :

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah media agar *Mac Conkey* (MC) dan media agar *Mueller Hinton* (MH). Media agar MC adalah salah satu jenis media yang digunakan untuk identifikasi mikroorganisme. Media agar MC termasuk dalam media selektif dan diferensial bagi mikroba. Jenis mikroba tertentu akan membentuk koloni dengan ciri tertentu yang khas apabila ditumbuhkan pada media ini. Media agar MH adalah media terbaik untuk pemeriksaan sensibilitas tes (dengan metode *Kirby-Bauer*) pada bakteri *non-fastidious* (baik aerob dan anaerob fakultatif).
- b. Variabel terikat adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yaitu daya hambat antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya zona jernih (radikal) di sekitar *disk* cakram antibiotik ciprofloxacin pada media agar MC dan media agar MH yang dapat diukur dalam satuan milimeter (mm) dengan skala rasio.
- c. Variabel pengganggu (terkendali) adalah Jarak antar *disk* cakram, Ketebalan media, Suhu / Temperatur, Waktu Inkubasi, Kekeruhan / Konsentrasi sel bakteri *Escherichia coli*, Ketelitian pengamatan ukuran zona hambat.

Definisi Operasional Variabel :

- 1) Jarak Antar *disk* cakram adalah jarak minimal 15 mm antara *disk* satu dengan yang lain. Untuk menghindari terjadinya zona hambat yang tumpang tindih. Dikendalikan dengan menggunakan petrie disk

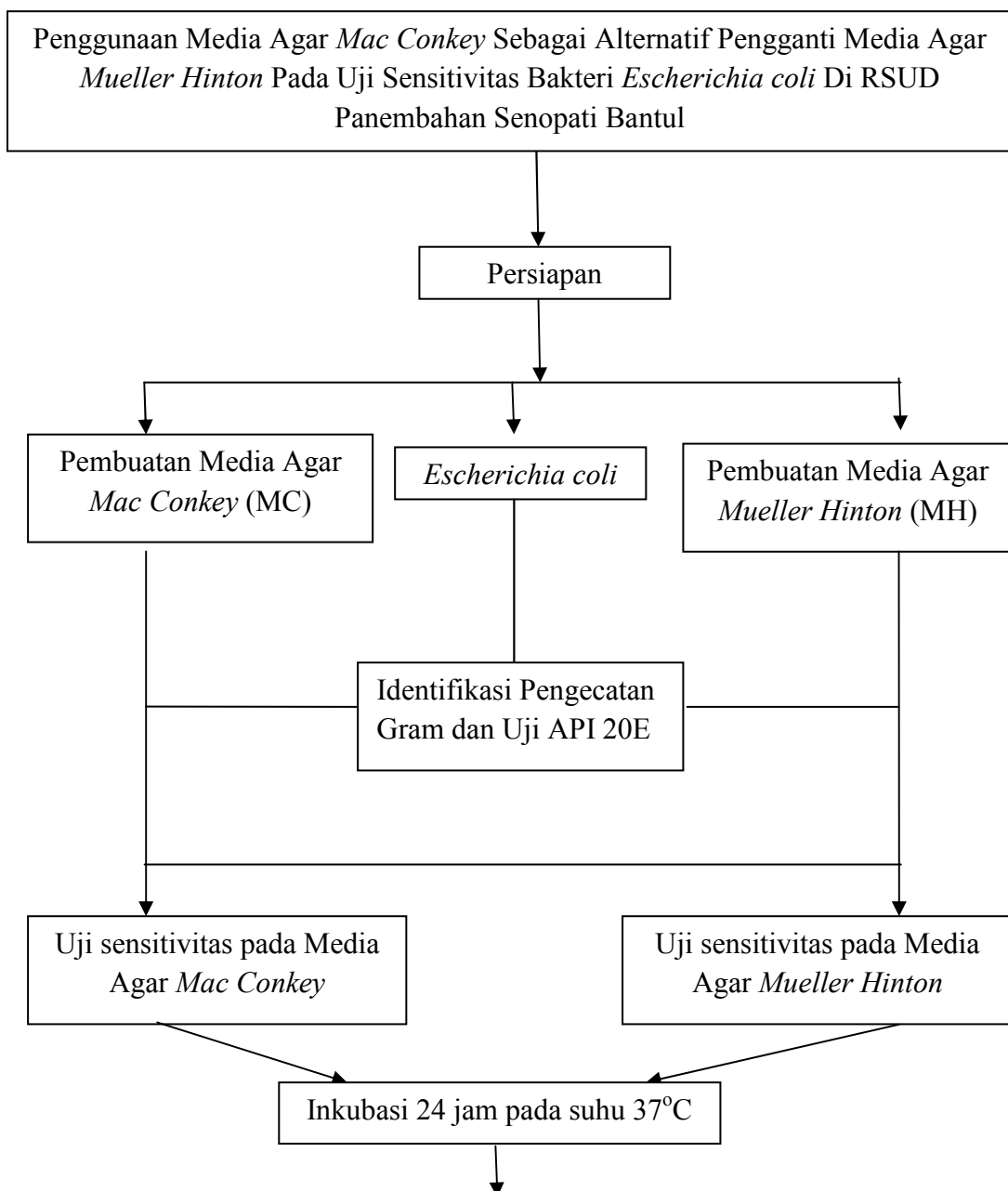
- ukuran 90 x 15 mm diisi 3 (tiga) sampai 4 (empat) disk. (Soemarno, 2000)
- 2) Ketebalan Media agar-agar sekitar 4 mm, kurang dari itu difusi obat lebih cepat, lebih dari itu difusi obat lambat. Dikendalikan dengan menuang agar-agar pada petrie *disk* sebanyak 15 ml. (Soemarno, 2000)
 - 3) Suhu / Temperatur adalah untuk memperoleh pertumbuhan yang optimal, inkubasi dilakukan pada suhu 35°C. Kurang dari 35°C menyebabkan diameter zona hambat lebih lebar, sehingga Resisten dilaporkan Sensitif. Ini bisa terjadi pada media plate yang ditumpuk-tumpuk lebih dari 2 (dua) plate pada saat inkubasinya. Plate yang ditengah suhunya kurang dari 35°C. Inkubasi pada suhu lebih 35°C terkadang ada bakteri yang kurang subur pertumbuhannya dan ada pula obat yang difusinya kurang baik. Oleh karena itu dikendalikan dengan pengaturan dan pemantauan suhu yang tepat. (Soemarno, 2000)
 - 4) Waktu Inkubasi adalah lamanya penyimpanan bakteri *Escherichia coli* setelah ditanam pada media agar MC dan media agar MH pada uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin di dalam inkubator selama 16-18 jam. Kurang dari 16 jam pertumbuhan bakteri belum sempurna sehingga sukar dibaca diameter zona hambatnya atau diameter zona hambat lebih lebar. Lebih dari 18 jam pertumbuhan bakteri lebih sempurna sehingga diameter zona hambat makin sempit. Oleh karena

itu dikendalikan dengan memberikan catatan waktu pembacaan masing-masing media.

- 5) Kekeruhan dan Konsetrasi sel bakteri *Escherichia coli* adalah pembuatan suspensi bakteri untuk uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin, menggunakan standar kekeruhan Mc farland, dibuat dari 0,5 ml Barium chloride 1% dan 9,5 ml asam sulfat 1%. Standar kekeruhan ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Setara dengan 1.500×10^6 sel/ml (Soemarno, 2000). Oleh karena itu dikendalikan dengan cara pembuatan suspensi dalam sekali waktu kurang dari 30 (tiga puluh) menit untuk ditanam di 8 (delapan) plate media agar MC dan 8 (delapan) plate media agar MH.
- 6) Ketelitian pengamatan ukuran zona hambat radikal adalah lebarnya diameter (garis tengah) zona jernih yang terbentuk di sekitar cakram kertas pada media agar MC dimana koloni bakteri *Escherichia coli* pada media ini tumbuh sedikit berkabut, sehingga perlu ketelitian pada saat pengamatan zona jernih dikendalikan dengan pembacaan di tempat yang terang, atau bisa juga dengan membuka tutup plate, kemudian diukur pada permukaan agar-agar. (Soemarno, 2002)

E. Alur Penelitian

Alur penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 9.



Pengukuran Diameter Zona Hambat Radikal pada media agar *Mac Conkey* dan media agar *Mueller Hinton* (mm)

Gambar 9. Alur Penelitian

F. Instrumen dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas ukur, labu *Erlenmeyer*, timbangan analitik, *refrigerator*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spritus, kawat ose, kapas, spuit, *cawan petri*, seal, alumunium foil, kapas lidi, inkubator, oven (sterilisator), penggaris dari *oxid*, *microwave* dan autoklaf. Selain peralatan yang telah disebutkan diatas, pada penelitian ini juga akan menggunakan bahan *disk* atau cakram antibiotik Ciprofloxacin, Larutan NaCl steril, media agar *Mac Conkey* (MC), dan media agar *Mueller Hinton* (MH).

G. Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan terlebih dahulu dilakukan sterilisasi yang gunanya untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme pada alat dan bahan yang akan digunakan. Proses sterilisasi tersebut dilakukan dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan alumunium foil dalam keadaan rapat sehingga udara tidak dapat masuk. Setelah dilakukan pembungkusan, kemudian peralatan tersebut dimasukkan

ke dalam oven pada suhu 160°C selama 2 jam. Setelah 2 jam peralatan tersebut dikeluarkan dan siap untuk digunakan. Jika dalam proses penelitian menggunakan kawat ose, maka sebelum kawat ose tersebut digunakan terlebih dahulu harus dipanaskan dengan menggunakan lampu spiritus. Sterilisasi bahan media dilakukan menggunakan autoklaf selama 15 menit, 121°C, 1.5 atm.

2. Pembuatan Media Agar *Mueller Hinton* (MH)

Media agar MH dibuat dengan cara : (Usi Sukorini, 2010)

- a. Menimbang serbuk media agar MH dengan timbangan analitik sebanyak 3,8 gram.
- b. Dimasukkan ke dalam labu *Erlenmeyer*.
- c. Masukkan aquades sebanyak 100 ml ke dalam labu *Erlenmeyer* yang sama.
- d. Mulut labu *Erlenmeyer* ditutup dengan kapas yang dibalut kasa dilapisi dengan alumunium foil.
- e. Media dipanaskan di dalam *microwave* hingga larut.
- f. Media disterilkan dalam autoklaf selama \pm 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 – 20 menit.
- g. Larutan dibiarkan hingga suhu turun menjadi \pm 50°C.
- h. Dituangkan ke dalam 6 cawan petri dengan masing-masing cawan petri berisi 15 ml, setelah media MH mengeras, kemudian media MH tersebut diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C dengan

tujuan mengetahui kualitas kesterilan media MH ini untuk meyakinkan bahwa media ini dapat mendukung pertumbuhan organisme yang ada dalam spesimen.

3. Pembuatan Media Agar *Mac Conkey* (MC)

Media agar MC dibuat dengan cara: (Usi Sukorini, 2010)

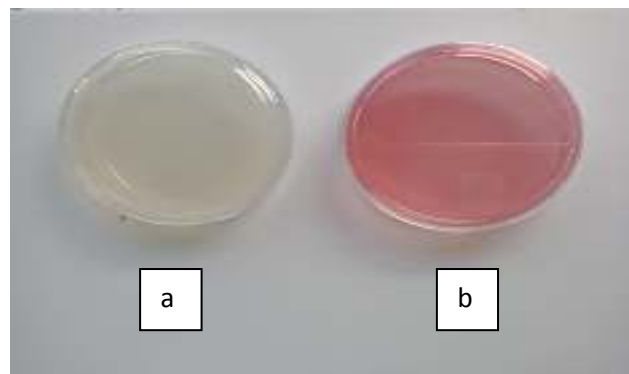
- a. Menimbang 50 gram bubuk media agar MC.
- b. Dilarutkan dengan aquades sebanyak 1000 ml.
- c. Dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan media.
- d. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- e. Tunggu suhu sampai hangat - hangat kuku (45°C – 50°C).
- f. Homogenkan lalu tuang ke dalam cawan petri.

Kemudian media MC tersebut diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C dengan tujuan mengetahui kualitas kesterilan media MC ini untuk meyakinkan bahwa media ini dapat mendukung pertumbuhan organisme yang ada dalam spesimen. Menghambat pertumbuhan organisme komensal, menunjukkan respon biokimiawi yang khas dan stabil

Pembuatan media-media ini ditunjukkan pada Gambar 10 dan Gambar 11.



Gambar 10. Pembuatan media agar *Mueller Hinton* dan media *Mac Conkey* di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Panembahan Senopati Bantul



Gambar 11. Media agar *Mueller Hinton* (a) dan Media agar *Mac Conkey* (b) pada plate 90 x 15 mm.

4. Uji Kemurnian *Escherichia coli*

Uji kemurnian *Escherichia coli* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi RSUD Panembahan Senopati Bantul dilakukan dengan menggunakan *Analytical Profile Index 20E* (API 20E) dengan cara :

a. Hari pertama :

1. Kultur induk *Escherichia coli* diinokulasikan pada media agar *Mac Conkey* (MC).
2. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

b. Hari kedua (preparasi inokulum) :

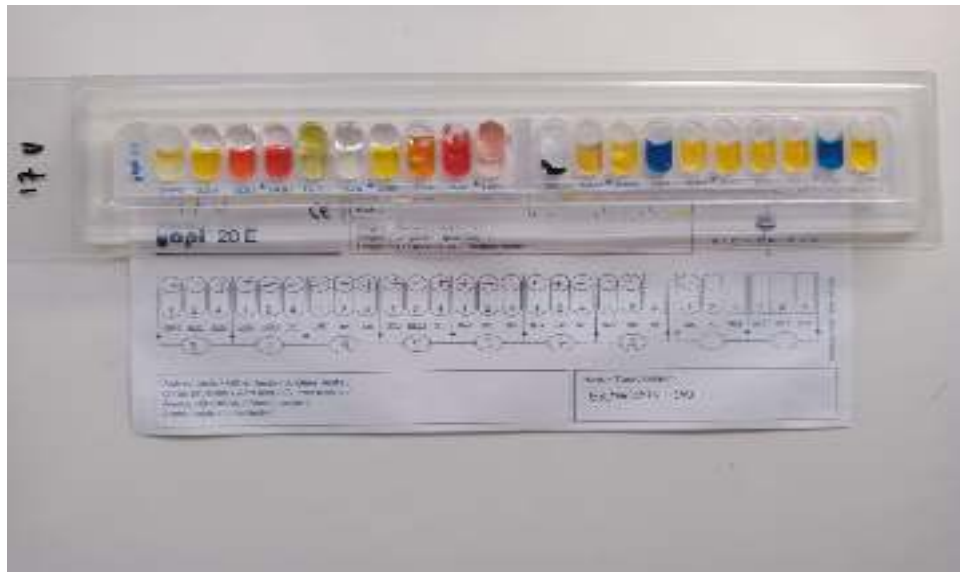
1. Koloni tersangka *Escherichia coli* pada media agar MC dilakukan pewarnaan Gram dilihat pada mikroskop.
2. Koloni tersangka *Escherichia coli* diambil menggunakan *micropipette*.
3. Ke dalam 5 ml medium API NaCl 0,85%, diemulsikan hati-hati untuk memperoleh suspensi bakteri yang homogen.
4. Kemudian inokulasi strip menggunakan *micropipette* yang sama, dimasukkan suspensi bakteri ke dalam tube pada strip (untuk menghindari pembentukan gelembung pada bagian dasar *tube*, strip dimiringkan dan ditempatkan tip *PSIpette* pada sisi *cupule*).
5. Kemudian diisi *tube* dan *cupule* nya untuk tes (CIT), (VP), dan (GEL).
6. Untuk tes yang lain, diisi *tubenya* saja (bukan *cupule*).
7. Lalu box ditutup dan diinkubasi.
8. Diinkubasi pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 18 - 24 jam.

c. Hari Ketiga :

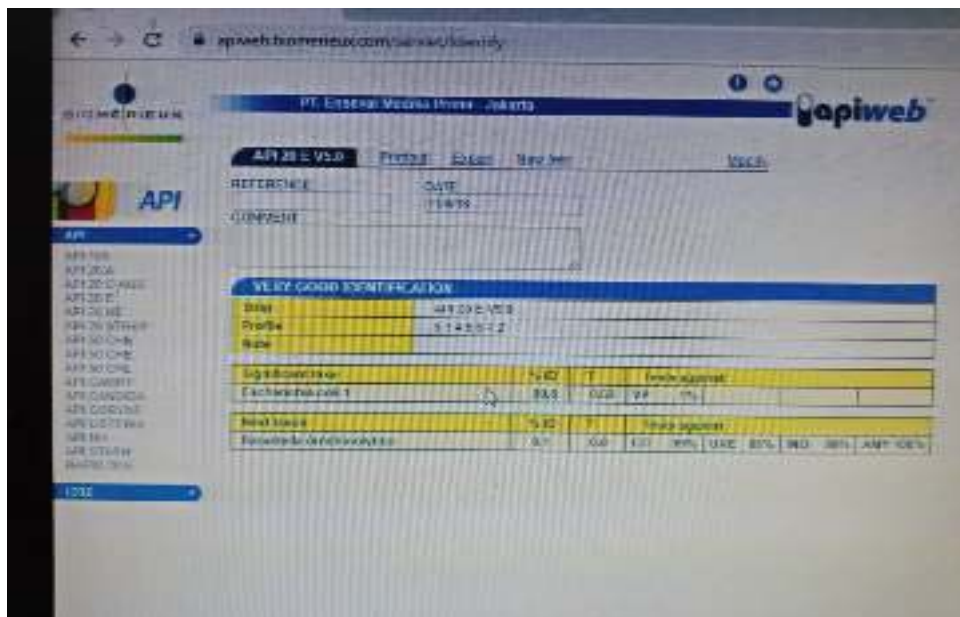
1. Setelah periode inkubasi, pembacaan strip mengacu pada *Reading Table*.
2. Jika 3 (tiga) tes atau lebih (tes GLU + atau -) adalah positif, dicatat semua reaksi spontan pada *result sheet*. Kemudian dilakukan tes yang memerlukan reagen tambahan yaitu

- a) Tes deteksi diaminase enzim triptofan (TDA) dengan ditambahkan 1 tetes TDA reagen (warna coklat kemerahan menunjukkan reaksi positif)
 - b) Tes produksi indol dari triptofan (IND) dengan ditambahkan 1 tetes *James reagen* (warna merah muda menunjukkan reaksi positif)
 - c) Tes Voges Proskauer untuk deteksi asetoin (VP) dengan ditambahkan 1 tetes masing-masing VP1 dan VP2 reagen. Tunggu setidaknya 10 menit (warna merah atau pink menunjukkan reaksi positif).
3. Identifikasi diperoleh melalui *numerical profile*.
- a) Penentuan *numerical profile*.
Setiap 3 (tiga) tes dikelompokkan dan hasil positif dijumlah sehingga diperoleh 7 (tujuh) digit angka profil (*numerical profile*).
 - b) Identifikasi menggunakan *apiweb identification software*.
Dimasukkan ketujuh angka profil secara manual menggunakan keyboard.

Sesuai identifikasi dari *apiweb identification software* didapatkan bahwa koloni yang dipakai untuk penelitian 99,8 % bakteri *Escherichia coli* seperti terlihat pada Gambar 12 dan Gambar 13.



Gambar 12. Hasil uji kemurnian bakteri *Escherichia coli* menggunakan API 20E.



Gambar 13. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* menggunakan *apiweb identification software* API 20E.

5. Pembuatan Standar Kekeruhan Mc Farland

Standar kekeruhan Mc Farland merupakan suatu bentuk skala yang memiliki ukuran dari nomor satu hingga sepuluh, skala ini menunjukkan

konsentrasi bakteri per mili liter. Standar ini dibuat untuk memperkirakan konsentrasi bakteri Gram negatif. (Whitman and MacNair, 2004).

Standar kekeruhan Mc Farland dapat digunakan untuk menentukan perkiraan konsentrasi sel pada suspensi atau larutan. Standar Mc Farland yang digunakan untuk uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri Gram negatif di RSUD Panembahan Senopati Bantul yaitu menggunakan Skala Mc Farland 5 cara pembuatannya dari 0,5 ml Barium chloride 1% dan 9,5 ml asam sulfat 1%.

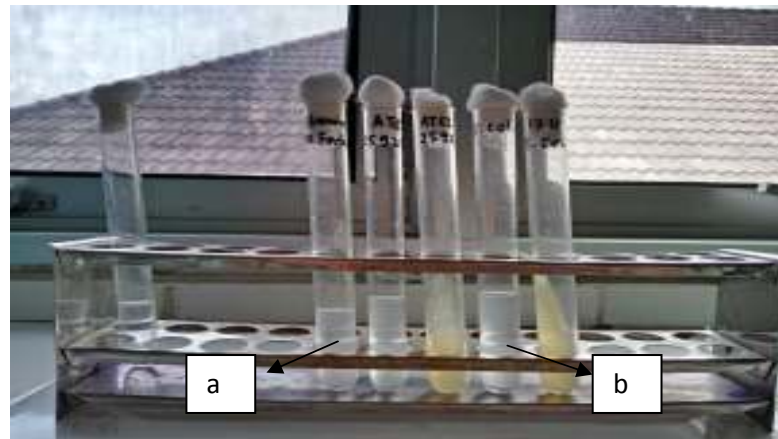
Standar kekeruhan ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan, setara dengan 1.500×10^6 sel/ml (Soemarno, 2000). Jumlah bakteri dalam Skala Mc Farland ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Jumlah bakteri dalam Skala Mc Farland

Skala Mc Farland	Bakteri ($\times 10^6$ / ml)
0,5	< 100
1	300
2	600
3	900
4	1.200
5	1.500
6	1.800
7	2.100
8	2.400
9	2.700
10	3.000

Sumber : Whitman dan MacNair (2004)

Pembuatan Standar Mc Farland 5 ditunjukkan pada Gambar 14.



Gambar 14. Pembuatan Standard Mc Farland 5 (a), Suspensi bakteri *Escherichia coli* (b)

6. Uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Menggunakan metode difusi cakram untuk menguji antibiotik ciprofloxacin dengan media agar MC dan MH dengan cara ke dalam suspensi *Escherichia coli* yang telah sesuai dengan standar Mc Farland 5, dicelupkan lidi kapas steril dan ditunggu sebentar supaya suspensi cairan dapat meresap ke dalam kapas. Kemudian lidi diangkat dan diperas dengan menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar. Kemudian lidi kapas digores-goreskan pada permukaan agar plate MH ditunjukkan pada Gambar 15 dan agar plate MC ditunjukkan pada Gambar 16 sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan, dilakukan 3 (tiga) kali penggoresan permukaan. Dari goresan I ke goresan II, plate diputar 90° sedangkan dari goresan II ke goresan III, plate diputar 45° . Media agar plate MH dan MC dibiarkan di atas meja selama 5 – 15 menit supaya suspensi bakteri meresap ke dalam agar-agar.

Kemudian *disk* cakram antibiotik ciprofloxacin dimasukkan ke media agar plate MH dan media agar plate MC yang telah ditutupi oleh suspensi bakteri dengan menggunakan pinset, dimana ada 4 (empat) *disk* antibiotik ciprofloxacin disetiap media agar plate ditunjukkan pada Gambar 17 dan 18.



Gambar 15. Penggoresan suspensi cairan bakteri *Escherichia coli* pada media agar *Mueller Hinton* (MH).



Gambar 16. Penggoresan suspensi cairan bakteri *Escherichia coli* pada media agar *Mac Conkey* (MC).



Gambar 17. Penempelan 4 (empat) *disk* antibiotik ciprofloxacin pada media agar MH.



Gambar 18. Penempelan 4 (empat) *disk* antibiotik ciprofloxacin pada media agar MC.

7. Pengamatan / pengukuran diameter zona hambatan

Dengan beralaskan kertas berwarna gelap atau dengan latar belakang sedikit gelap, dengan mata langsung diukur diameter zona hambatan yang terjadi pada media agar MC dan media agar MH plate, menggunakan penggaris dari *oxid*.

Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih di sekitar *disk* (tidak ada pertumbuhan bakteri), diukur dari ujung yang satu ke ujung yang lain melalui tengah-tengah *disk*. Seperti terlihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan penggaris dari *oxoid* dengan alas berwarna gelap.

Hasil pengukuran diameter zona hambatan dibandingkan dengan klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri seperti yang ditunjukkan pada tabel klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri menurut *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Ditunjukkan pada Tabel 3 halaman 28. Kategori sedang atau intermediet untuk kepentingan klinis dimasukkan dalam kategori resisten.

H. Manajemen Data

1. Pengumpulan Data

Data penelitian adalah hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk disekitar *disk blank* dan pengukuran diameter zona hambat tersebut menggunakan penggaris dari *oxoid* dengan skala ukuran mm.

Menurut Baley dan Mahmud (2012) Ukuran sampel yang digunakan untuk penelitian dengan menggunakan analisis data statistik jumlah minimum adalah 30 (tiga puluh). Roscoe dalam Sugiyono (2012) juga menyebutkan bahwa ukuran yang layak dalam penelitian adalah 30-500 sampel.

Enampuluh empat (64) data diameter zona hambat (mm) pada uji sensitivitas bakteri *Escherichia coli* terdiri dari tiga puluh dua (32) data diameter zona hambat dari media agar *Mac Conkey* dan tiga puluh dua (32) data diameter zona hambat dari media agar *Mueller Hinton*.

2. Analisis Data

Analisis Data dan pengolahan data :

a. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan diameter zona hambat pada uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli* pada media agar *Mac Conkey* dan media agar *Mueller Hinton*. Data disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dibuat grafik berbentuk batang.

b. Analisis Analitik

Data dibandingkan dengan klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri menurut *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* sesuai dengan Tabel 3 halaman 28.

c. Analisis Statistik

Data yang digunakan adalah data primer. Data primer tersebut dilakukan uji normalitas data, jika data tersebut berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas data, jika data tersebut homogen kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan uji *Independent Samples T test*. Sedangkan jika data tersebut tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Man Whitney* atau data diubah menjadi skala ordinal atau nominal. Analisis statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak pengolah data SPSS 19 *for windows* dengan taraf signifikansi 5% yang artinya hipotesis diterima apabila $asym\ sig > 0,05$ (Sugiyono, 2010). Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah :

H_0 : Tidak ada perbedaan ukuran diameter zona hambat antara media agar *Mac Conkey* dengan media agar *Mueller Hinton* pada uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli*.

H_a : Ada perbedaan ukuran diameter zona hambat antara media agar *Mac Conkey* dengan media agar *Mueller Hinton* pada uji sensitivitas antibiotik ciprofloxacin terhadap bakteri *Escherichia coli*.