

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *true experimental design* dengan rancangan acak kelompok. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan ada atau tidak adanya perbedaan yang bermakna diameter zona hambat dari antimikroba siprofloksasin generik berlogo dan generik merek dagang terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Parameter aktivitas antimikroba yang diukur adalah diameter zona hambat, menggunakan metode difusi cakram dengan pengulangan sebanyak 2 kali (duplo) untuk setiap sampel.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua siprofloksasin generik berlogo dan generik merek dagang dengan kekuatan obat 500 mg di Jawa Timur.

##### 4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin 500 mg generik berlogo yang diproduksi oleh PT. Kimia Farma, PT. Bernofarm, PT. Phapros, PT. Hexpharm Jaya, dan PT. Novell. Siprofloksasin 500 mg generik merek dagang yang digunakan

dalam penelitian ini diproduksi oleh PT. Novapharin, PT. Kimia Farma, PT. Sanbe, PT. Errita Pharma, dan PT. Graha Farma.

### 4.3 Besar Sampel

Untuk menghitung besar sampel dapat digunakan dengan rumus Federer (Federer, 1991):

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = besar sampel

p = jumlah kelompok

karena jumlah kelompok (p) adalah 4, maka:

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 = 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 5 sampel untuk setiap kelompok.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah tablet siprofloksasin generik berlogo dan generik merek dagang dengan kekuatan obat sebesar 500 mg.

#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat siprofloksasin terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus*.

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.5.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### 4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai Bulan April - Juni 2015.

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 Alat

Tabung reaksi, mikropipet, tip kecil, cawan petri, ose, lidi kapas, lampu spirtus, pinset, lemari pendingin, inkubator, vortex, gelas objek.

##### 4.6.2 Bahan

###### a. Bahan utama

Koleksi isolat bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

###### b. Antimikroba siprofloksasin generik berlogo dan generik merek dagang dengan kekuatan obat sebesar 500 mg.

- c. Media tanam padat: BSA, MHA, TSI.
- d. Cat gram.

#### 4.7 Definisi Operasional

Pada penelitian ini terdapat beberapa hal yang perlu untuk diketahui, yaitu:

- a. Siprofloksasin 500 mg generik berlogo yang diproduksi oleh PT. Kimia Farma, PT. Bernofarm, PT. Phapros, PT. Hexpharm Jaya, dan PT. Novell. Siprofloksasin 500 mg generik merek dagang yang diproduksi oleh PT. Novapharin, PT. Kimia Farma, PT. Sanbe, PT. Errita Pharma, dan PT. Graha Farma.
- b. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Salmonella* Typhi yang berasal dari spesimen darah pasien dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari spesimen pus pasien di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok siprofloksasin generik berlogo yang diuji aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri *Salmonella* Typhi, kelompok siprofloksasin generik berlogo yang diuji aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, kelompok siprofloksasin generik merek dagang yang diuji aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri *Salmonella* Typhi, dan kelompok siprofloksasin generik merek dagang yang diuji aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

- d. Konsentrasi siprofloksasin yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 5 µg. Pembuatan cakram siprofloksasin adalah tablet siprofloksasin 500 mg dilarutkan dalam akuades.
- e. Hasil penelitian diameter zona hambat yang diukur menggunakan penggaris dinyatakan dalam satuan millimeter.
- f. Siprofloksasin yang dimasukkan ke dalam disk adalah suspensi.

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Identifikasi *Salmonella Typhi*

Sebelum digunakan dalam penelitian, isolat *Salmonella Typhi* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan pewarnaan gram, inokulasi pada BSA, inokulasi pada TSI (*Triple Sugar Iron*) agar, dan tes oksidase (Dzen *dkk.*, 2003).

Dari isolat yang telah tersedia kemudian dibiakkan pada medium MHA dan BSA pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam. Dari koloni yang tumbuh dilakukan pewarnaan Gram dan dilanjutkan dengan penanaman pada medium diferensial *Mac Conkey* dan medium selektif BSA pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam. Koloni yang tumbuh pada medium *Mac Conkey* dilakukan uji oksidase (Dzen *dkk.*, 2003).

##### 4.8.1.1 *Bismuth Sulfit Agar (BSA)*

1. Dilakukan inokulasi bakteri *Salmonella Typhi* dengan digoreskan secara zig-zag pada medium BSA.
2. Diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.

3. Hasil positif: ditemukan morfologi koloni bakteri *Salmonella* Typhi yang berbentuk bulat kecil, permukaan cembung, tepi rata, tidak berbau, dan didapatkan koloni khas berwarna hitam metalik.

#### 4.8.1.2 Pewarnaan Gram

1. Dipersiapkan gelas objek dengan cara dibersihkan permukaannya dengan kapas dan dilewatkan di atas api bunsen beberapa kali untuk menghilangkan lemak pada gelas objek, kemudian didinginkan.
2. Ditetaskan satu ose akuades steril dan ditambahkan dengan satu ose sediaan bakteri kemudian disuspensikan.
3. Dikeringkan sediaan dan difiksasi dengan melewati sediaan di atas api sebanyak tiga kali.
4. Ditetaskan Kristal violet pada sediaan hingga memenuhi seluruh gelas objek dan didiamkan selama 1 menit. Dibuang sisa Kristal violet dan dibilas dengan air bersih.
5. Ditetaskan lugol pada sediaan hingga memenuhi seluruh gelas objek dan didiamkan selama satu menit. Dibuang sisa lugol dan dibilas dengan air bersih.
6. Ditetaskan alkohol 96% pada sediaan hingga memenuhi seluruh gelas objek dan didiamkan selama 5-10 detik. Dibuang sisa alkohol.
7. Ditetaskan safranin pada sediaan hingga memenuhi seluruh gelas objek dan didiamkan selama 30 detik. Dibuang sisa safranin dan sediaan dibilas dengan air bersih.
8. Dikeringkan sediaan dengan kertas penghisap.
9. Dilihat sediaan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

10. *Salmonella* Typhi berbentuk batang warna merah (Gram negatif).

#### 4.8.1.3 Penanaman *Salmonella* Typhi pada agar *Mac Conkey*

Penanaman bakteri *Salmonella* Typhi pada agar *Mac Conkey* dilakukan setelah identifikasi pewarnaan Gram. Uji ini dilakukan dengan cara:

1. Diambil koloni bakteri *Salmonella* Typhi dengan ose.
2. Digoreskan secara zig-zag pada permukaan media.
3. Diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
4. Koloni *Salmonella* Typhi berbentuk bulat dan tidak berwarna.

#### 4.8.1.4 Uji TSI (*Triple Sugar Iron*) *Salmonella* Typhi

1. Diambil koloni bakteri *Salmonella* Typhi.
2. Ditusukkan ose ke dalam agar TSI hingga mencapai dasar tabung.
3. Digoreskan ose secara zig-zag pada permukaan media.
4. Diinkubasi agar TSI berkoloni dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
5. *Salmonella* Typhi menunjukkan alkali/asam, H<sub>2</sub>S positif, dan gas negatif.

#### 4.8.2 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan ditanam bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* pada NAP dan diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Sebelum digunakan dalam penelitian, *Staphylococcus aureus* yang akan digunakan harus diidentifikasi ulang. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram, kultur diferensiasi pada media *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan konsentrasi garam NaCl 7,5-10% untuk

mengetahui sifat fermentasi terhadap manitol, uji katalase, dan uji koagulase ulang.

#### 4.8.2.1 Prosedur pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus*

1. Mengambil isolat bakteri yang telah dipreparasi sebelumnya ke atas permukaan gelas objek, kemudian dikeringkan dan dilakukan fiksasi dengan api.
2. Sediaan ditetesi dengan Kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Sisa Kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
3. Sediaan ditetesi lagi dengan larutan lugol kemudian ditunggu selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
4. Alkohol 96% dituang ke atas sediaan dan dibiarkan selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
5. Kemudian safranin dituang di atas sediaan dan dibiarkan selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dapat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Dicari adanya sel bakteri bersifat Gram positif, berbentuk kokus (bulat) dan bergerombol.

#### 4.8.2.2 Prosedur penanaman pada media *Manitol Salt Agar (MSA)*

1. Bakteri yang akan diuji digoreskan secara zig-zag pada media *Manitol Salt Agar (MSA)* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah dan diinkubasi selama 24-48 jam.

2. Dari koloni tersebut diamati sifat fermentasi manitol berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni *Staphylococcus aureus*.

#### 4.8.2.3 Tes katalase

1. Menyediakan perbenihan cair kuman pada gelas objek.
2. Sediaan tersebut ditetesi dengan larutan  $H_2O_2$  3%.
3. Memperhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Bila ada gelembung udara maka tes katalase positif.

#### 4.8.2.4 Tes koagulase

1. Mengambil dan membersihkan gelas objek.
2. Suspensi kuman dibuat di atas gelas objek dari 1 tetes larutan salin atau akuades steril dengan 1 koloni kuman dari biakan pada NAP.
3. Satu tetes plasma darah ditetaskan pada suspensi kuman dan diusahakan agar tercampur dengan cara menggoyangkan gelas objek dengan arah melingkar dalam waktu 5-10 detik.
4. *Staphylococcus aureus* memberikan tes koagulase positif yang ditunjukkan dengan adanya gumpalan-gumpalan berwarna putih.

#### 4.8.3 Persiapan sampel

1. Tablet siprofloksasin 500 mg digerus sampai halus.
2. Dimasukkan serbuk siprofloksasin ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas 100 mL, dikocok hingga homogen sehingga didapatkan suspensi siprofloksasin 5 mg/mL.

3. Dari suspensi di atas diambil 0,1 mL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas 100 mL, dikocok hingga homogen sehingga didapatkan konsentrasi siprofloksasin 5 µg/mL.

**Rumus pengenceran:**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$5000 \mu\text{g/mL} \times V1 = 5 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL}$$

$$V1 = 500 \mu\text{g} : 5000 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 0,1 \text{ mL}$$

#### 4.8.4 Uji Aktivitas Antimikroba

- 1) Lempeng agar MHA ditandai dengan nama, tanggal, dan bakteri yang akan diuji.
- 2) Kapas lidi steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji dengan OD: 0,1 CFU/mL.
- 3) Kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.
- 4) Bakteri disebarakan pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 90 derajat dan dibuat olesan kedua dengan lempeng agar diputar 45 derajat dan dibuat olesan ketiga.
- 5) Setelah itu, lempeng dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian ditempelkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.

- 6) Kemudian kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena dapat merusak permukaan agar. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
- 7) Diukur diameter zona jernih yang terbentuk di permukaan agar.

#### 4.9 Analisis Data

Data yang diambil berupa rata-rata diameter zona hambat dari masing-masing sampel terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji homogenitas. Bila sebaran data normal dan ragam data homogen ( $p > 0,05$ ) maka digunakan analisis statistik *Independent t-Test* dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 0,05$ ).