

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post-test only design* untuk membuktikan adanya perbedaan efektivitas madu dan propolis sebagai antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro* dengan metode dilusi agar.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel berupa madu dan propolis cair dari lebah *Apis mellifera* yang berasal dari peternakan Madu Pramuka Cibubur, Jawa Barat. Bakteri MRSA yang digunakan berasal dari stok bakteri Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Perhitungan besar sampel minimal dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu:

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

Ket :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi / pengulangan (Supranto, 2000)

Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan yang digunakan pada masing-masing bahan antimikroba yang diuji adalah 6 kelompok. Perhitungan besar sampel untuk penelitian masing-masing bahan antimikroba adalah sebagai berikut:

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

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

$$5(r - 1) \geq 15$$

$$r - 1 \geq 3$$

$$r \geq 3 + 1$$

$$r \geq 4$$

Dari perhitungan didapatkan jumlah minimal pengulangan untuk satu kelompok perlakuan adalah 4 kali pengulangan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni - September 2016.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bahan antibakteri dan konsentrasi yang digunakan. Bahan antibakteri yang digunakan berupa madu dan propolis. Berdasarkan hasil uji pendahuluan, variasi konsentrasi yang digunakan untuk madu adalah sebesar 5%, 6%, 7%, 8%, 9% dan 10%. Untuk propolis, variasi konsentrasi yang digunakan adalah sebesar 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, dan 2,0%.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dari madu dan propolis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA.

4.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkenali pada penelitian ini adalah jenis madu dan propolis, serta *strain* bakteri MRSA yang digunakan.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Isolat bakteri yang digunakan adalah stok isolat bakteri MRSA dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari penderita di Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.

4.5.2 Madu

Madu yang digunakan dalam penelitian ini merupakan madu multiflora yang dihasilkan oleh lebah *Apis mellifera* yang berasal dari peternakan Madu Pramuka Cibubur.

4.5.3 Propolis

Propolis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan propolis dalam bentuk cair yang dihasilkan oleh *Apis mellifera* yang berasal dari peternakan Madu Pramuka Cibubur.

4.5.4 Konsentrasi Efektif

Konsentrasi efektif adalah konsentrasi minimal dari madu dan propolis yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada media Mueller Hinton yang telah dicampur bahan antimikroba pada metode dilusi agar.

4.5.5 Dilusi Agar

Metode penelitian dilusi agar dalam penelitian ini dilakukan dengan cara mencampur agar *Mueller Hinton* dengan madu atau propolis dalam konsentrasi tertentu dan dibiarkan mengeras. Setelah mengeras bakteri

diinokulasikan dengan cara digores di permukaan campuran agar dan madu atau agar dan propolis secara merata.

4.5.6 Kontrol Kuman

Kontrol kuman atau kontrol negatif pada penelitian ini berupa media Mueller Hinton yang tidak dicampur madu ataupun propolis yang kemudian ditetesi suspensi bakteri MRSA. Kontrol negatif digunakan untuk melihat pertumbuhan bakteri tanpa perlakuan.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

4.6.1.1 Alat:

- Object glass* dan kaca penutup
- Lampu spiritus atau bunsen
- Ose
- Mikroskop
- Rak Pewarnaan
- Tabung reaksi

4.6.1.2 Bahan:

- Isolat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*
- Nutrient Broth*
- Mueller Hinton Agar*
- CHROMagar
- Phenyl red mannitol salt agar*
- Aquades steril
- Kertas penghisap atau tissue
- Korek api
- Kristal violet

- j. Lugol
- k. Alkohol 96%
- l. Safranin
- m. Minyak emersi
- n. Larutan H_2O_2 3%
- o. Staphaurex latex

4.6.2 Alat dan Bahan Dilusi Agar

4.6.2.1 Alat:

- a. Inkubator
- b. Bunsen (lampu spiritus)
- c. Plate kosong dan steril
- d. Mikropipet 1ml
- e. Vorteks

4.6.2.2 Bahan:

- a. Madu
- b. Propolis
- c. Perbenihan cair bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*
- d. *Mueller Hinton Agar*
- e. Aquades

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Kultur pada Media CHROMagar

- 1) Biakan bakteri disiapkan pada medium cair BHI
- 2) Bakteri distreaking pada CHROMagar dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 18-24 jam.

- 3) Hasil koloni yang muncul diamati. Jika koloni yang terbentuk berwarna merah muda, maka bakteri tersebut kemungkinan adalah bakteri MRSA (Tille, 2014).

4.7.1.2 Pewarnaan Gram

- 1) Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Lalu dibiarkan dingin.
- 2) Satu tetes aquades steril atau larutan saline diteteskan pada gelas obyek.
- 3) Dengan menggunakan ose jarum yang steril, diambil sedikit koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada medium padat, kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline di gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
- 4) Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering, hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api sebanyak 3 kali.
- 5) Sediaan hapusan diletakan di atas bak pewarnaan dan dilakukan pewarnaan.
- 6) Sediaan hapusan ditetesi Kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian Kristal violet dibuang dan sediaan dibilas dengan air mengalir.
- 7) Sediaan hapusan ditetesi lugol dan dibiarkan selama 1 menit, Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir.
- 8) Sediaan hapusan ditetesi alkohol 96% selama 5-10 menit atau sampai cat luntur kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir.

- 9) Sediaan hapusan ditetesi safranin dan dibiarkan selama 30 detik kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air mengalir.
- 10) Sediaan hapusan dikeringkan menggunakan kertas penghisap.
- 11) Setelah kering sediaan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x dan sediaan ditetesi dengan minyak emersi.
- 12) Bakteri *Staphylococcus aureus* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri kokus berwarna ungu (gram positif) (Dzen *et al.*, 2010).

4.7.1.3 Tes Katalase

- 1) Koloni bakteri diambil dari media dengan menggunakan ose dan ditempatkan pada *object glass*.
- 2) Koloni bakteri ditetesi hydrogen peroksida.
- 3) Uji katalase positif jika terbentuk gelembung-gelembung gas O₂ akibat adanya reaksi enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji katalase positif menunjukkan koloni bakteri adalah bakteri *Staphylococcus* (Dzen *et al.*, 2010).

4.7.1.4 Tes Koagulasi

- 1) Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Lalu dibiarkan dingin.
- 2) Satu tetes aquades steril atau larutan saline ditetaskan pada gelas obyek.
- 3) Dengan menggunakan ose jarum yang steril, diambil satu ose koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada medium padat, kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline di gelas obyek.

- 4) Tambahkan satu tetes staphaurex latex pada suspensi bakteri di gelas obyek.
- 13) Uji koagulasi positif jika terbentuk gumpalan di gelas obyek yang menunjukkan bahwa koloni bakteri yang diuji adalah bakteri *Staphylococcus aureus* (Dzen et al., 2010).

4.7.1.5 Uji VITEK II

- 1) Siapkan 2 tabung berisi 3 ml larutan NaCl 0,45 % pH 5,0.
- 2) Ambil koloni bakteri MRSA dan suspensikan ke satu tabung larutan NaCl dengan tingkat kekeruhan setara dengan standar 0,5 McFarland.
- 3) Ambil 280 µl suspensi bakteri dari tabung inokulum pertama ke tabung kedua dengan menggunakan mikropipet.
- 4) Susun tabung pertama untuk identifikasi kemudian tabung kedua untuk tes sensitivitas antibiotik pada cassette.
- 5) Letakkan kartu Vitek 2, sesuai dengan urutan untuk identifikasi (warna biru) dan untuk sensitivitas (warna abu-abu) antibiotik.
- 6) Masukkan kedua tabung pada alat vitek dengan terlebih dahulu melakukan input data ke dalam komputer.
- 7) Selanjutnya card secara otomatis diproses dalam ruang vakum dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri MRSA

- 1) Bakteri MRSA yang sudah diidentifikasi dipindahkan ke dalam tabung yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
- 2) Bakteri dalam *nutrient broth* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

- 3) Setelah diinkubasi, biakan cair bakteri dinilai kepadatannya (OD= *Optical Density*) dengan menggunakan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm.
- 4) Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ ml yang setara dengan OD = 0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Ket :

N_1 : OD bakteri hasil spektrofotometri

V_1 : Volume bakteri yang ditambah pengencer

N_2 : OD bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/ml

V_2 : Volume suspensi bakteri uji

4.7.3 Penelitian Pendahuluan

Sebelum melakukan uji sensitivitas, dilakukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui rentang konsentrasi yang akan digunakan dalam uji sensitivitas.

4.7.3.1 Penentuan Konsentrasi Madu dan Ekstrak Propolis yang digunakan

- 1) Cawan petri sebanyak 13 buah (1 buah untuk kontrol kuman, 6 buah untuk madu dan 6 buah untuk propolis) diberi tanda untuk mengetahui konsentrasi madu dan propolis yang digunakan.
- 2) Madu dan propolis dengan volume masing-masing 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, dan 3 ml dimasukkan ke dalam cawan petri.
- 3) Agar *Mueller Hinton* ditambahkan ke dalam dalam cawan petri yang telah berisi madu dan propolis hingga jumlah volume dalam cawan petri mencapai 10 ml dan diperoleh konsentrasi madu dan propolis pada masing-masing cawan petri sebesar 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%.

- 4) Cawan petri digoyang-goyangkan supaya bahan antimikroba dan agar *Mueller Hinton* dapat tercampur dengan baik dan didiamkan hingga mengeras.
- 5) Campuran agar dan bahan antimikroba dibagi menjadi empat bagian dengan menggunakan pengaris dan ditetesi dengan suspensi bakteri MRSA 10^6 CFU/ml.
- 6) Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 7) Setelah proses inkubasi diamati adanya pertumbuhan koloni bakteri pada agar (CLSI, 2012).

Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan madu dengan konsentrasi 5% belum mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan madu dengan konsentrasi 10% telah dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dari hasil tersebut ditetapkan konsentrasi madu yang akan digunakan dalam penelitian adalah konsentrasi antara 5% dan 10%, yaitu konsentrasi 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%.

Hasil penelitian pendahuluan untuk propolis, tidak ditemukan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi $\geq 5\%$, sehingga dilakukan lagi penelitian pendahuluan dengan konsentrasi yang lebih rendah yaitu 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6%. Hasilnya didapatkan pertumbuhan bakteri pada propolis dengan konsentrasi 1% dan tidak didapatkan lagi pertumbuhan bakteri pada konsentrasi $\geq 2\%$. Oleh karena itu, konsentrasi propolis yang akan digunakan dalam penelitian adalah konsentrasi 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, dan 2,0%.

4.7.4 Uji Sensitivitas Metode Dilusi Agar

- 1) Sediakan 13 buah plate kosong dan steril dimana 1 plate untuk kontrol kuman (KK), 6 plate untuk uji sensitivitas madu dan 6 plate untuk uji sensitivitas propolis.

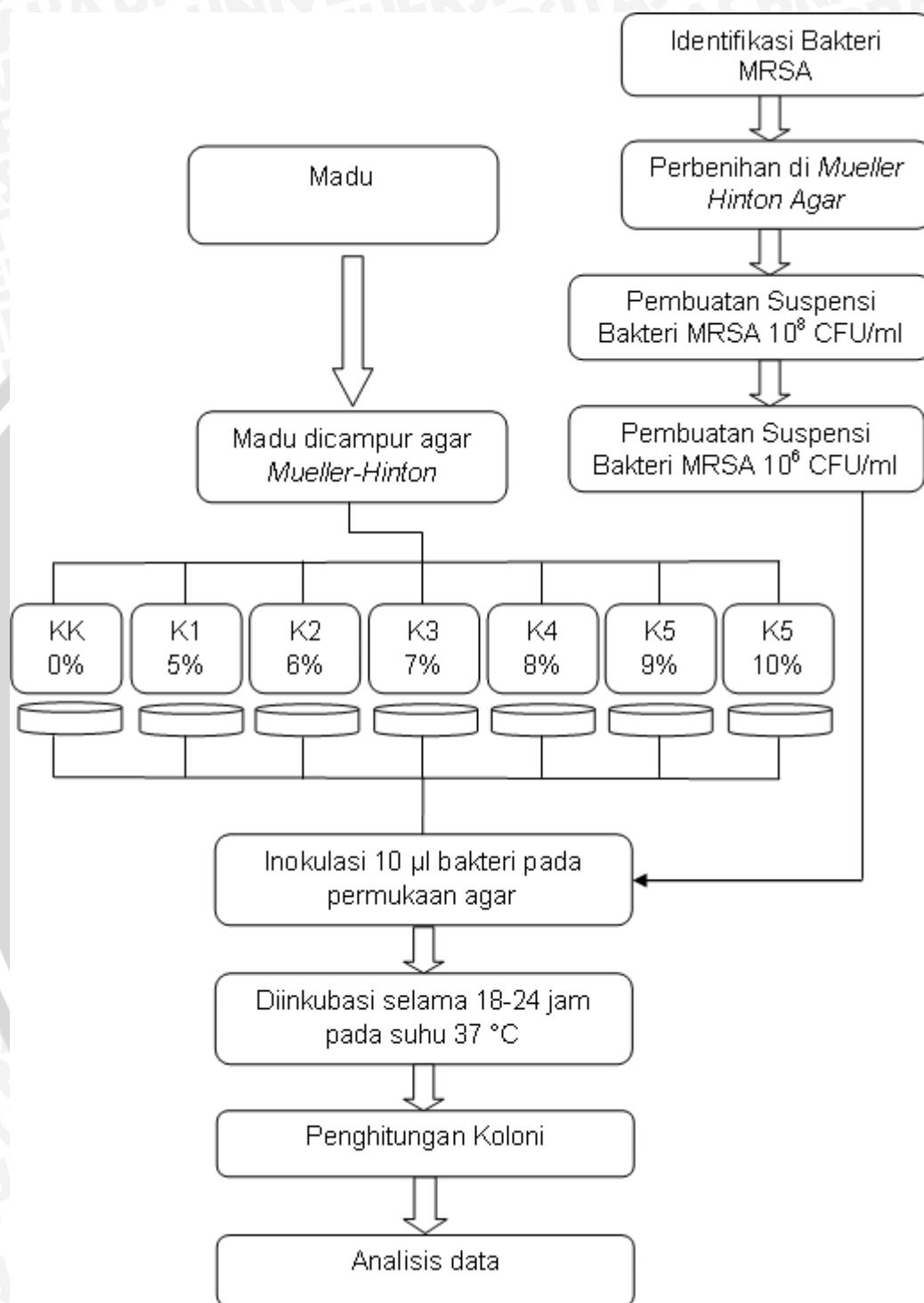
- 2) Agar *Mueller Hinton* dicampur dengan madu dengan konsentrasi madu dalam setiap plate masing-masing 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%.
- 3) Agar *Mueller Hinton* dicampur dengan propolis dengan konsentrasi propolis dalam setiap plate masing-masing 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, dan 2,0%.
- 4) Plate digoyang-goyangkan sehingga bahan antibakteri dan agar *Mueller Hinton* tercampur dengan baik dan didiamkan beberapa saat hingga mengeras.
- 5) Setelah mengeras bakteri MRSA 10^4 CFU/ml diinokulasikan ke permukaan agar dengan cara streaking secara merata.
- 6) Plate dimasukkan ke dalam incubator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 7) Diamati koloni bakteri yang terbentuk setelah proses inkubasi dan dihitung dengan menggunakan *colony counter* (CLSI, 2012).

4.8 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari semua kelompok diolah dengan program komputer *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) for windows*, untuk mengetahui uji komparasi dan uji korelasi dengan taraf signifikansi $p < 0,05$. Data yang akan diperoleh adalah data numerik tidak berpasangan dengan jumlah kelompok lebih dari 2 kelompok. Uji komparasi yang digunakan adalah uji parametrik One way ANOVA jika data yang diperoleh mempunyai distribusi normal dan varian yang sama. Untuk menguji apakah data mempunyai distribusi normal dilakukan uji Saphiro-Wilk dan untuk menguji varian data digunakan Lavene's test. Jika data yang diperoleh tidak memenuhi syarat uji parametrik maka digunakan uji alternatif Kruskal-Wallis. Untuk uji korelasi yang akan digunakan adalah uji Pearson.

4.9 Alur Penelitian

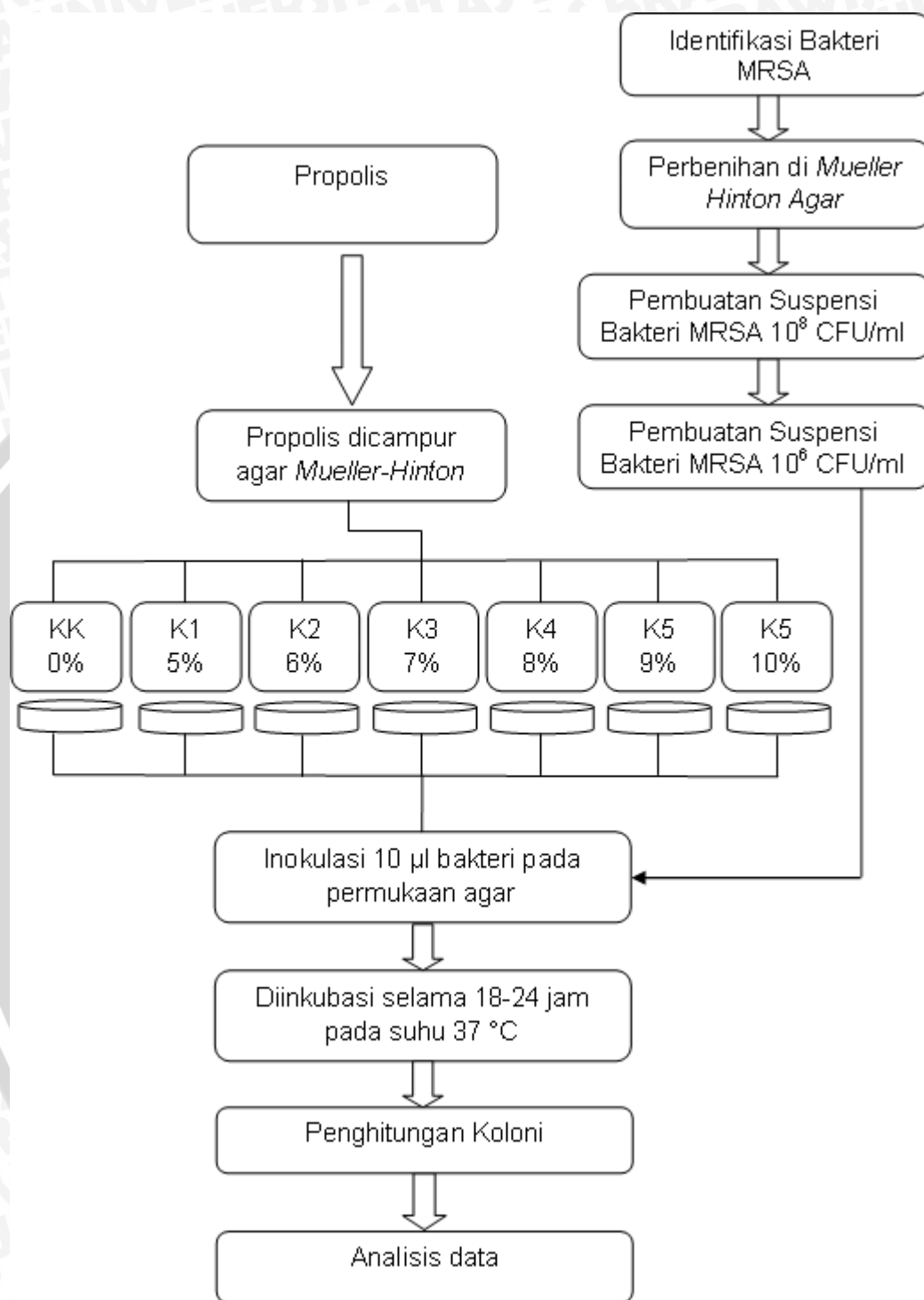
4.9.1 Uji Sensitivitas Madu



Gambar 4.1 Alur Penelitian Uji Sensitivitas Antimikroba Madu

KK : Kontrol Kuman

4.9.2 Uji Sensitivitas Propolis



Gambar 4.1 Alur Penelitian Uji Sensitivitas Antimikroba Propolis

KK : Kontrol Kuman