

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *true experimental design* dengan *post test only group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas (diameter zona hambat) dari antimikroba kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah metode difusi cakram yang masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali (duplo) untuk setiap sampel.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tablet Kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek dengan kekuatan Trimetropim 80 mg dan Sulfametoksazol 400 mg.

4.2.2 Jumlah Sampel

Untuk menghitung jumlah sampel dapat diketahui dengan rumus Federer (Notoatmodjo, 2010) :

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

karena jumlah perlakuan (p) adalah 12, maka :

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan diatas, maka diperoleh besar sampel sebanyak 5 sampel.

4.2.3 Sampel

Berdasarkan hasil perhitungan sampel, maka sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 5 buah tablet kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek. Tablet kotrimoksazol 480 mg generik berlogo yang diproduksi oleh PT.Sejahtera Lestari Farma, PT.Indofarma, PT.Nova Farma, PT. Rama Emerald Multi Sukses, dan PT.Phapros. Sedangkan untuk tablet kotrimoksazol 480 mg generik bermerek yaitu Sanprima dari PT.Sanbe, Ottoprim dari PT.Coronet crown, Bactrim dari PT.Roche Indonesia, Primadex dari PT.Feron, dan Novatrim dari PT. Nova Farma.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus*.

4.4 Definisi Operasional

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

- a. *Salmonella Typhi* yang digunakan didalam penelitian ini adalah bakteri yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari spesimen darah penderita.
- b. *Staphylococcus aureus* yang digunakan didalam penelitian ini adalah bakteri yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari spesimen pus penderita.
- c. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 µg/ml berdasarkan rekomendasi dari *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI) untuk metode difusi cakram.
- d. Zona hambat adalah daerah yang bebas dari pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus* yang terdapat disekitar disk yang telah diberi antimikroba kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek.

e. Hasil penelitian diameter zona hambat dinyatakan dalam satuan millimeter.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

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

4.5.2 Bahan

- 1) Koleksi isolat bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- 2) Tablet kotrimoksazol 480 mg generik berlogo yang yang diproduksi oleh PT.Sejahtera Lestari Farma, PT.Indofarma, PT.Nova Farma, PT. Rama Emerald Multi Sukses, dan PT.Phapros. Sedangkan untuk tablet kotrimoksazol 480 mg generik bermerek yaitu Sanprima dari PT.Sanbe, Ottoprim dari PT.Coronet crown, Bactrim dari PT.Roche Indonesia, Primadex dari PT.Feron, dan Novatrim dari PT. Nova Farma.
- 3) Media tanam padat : *Bismuth sulfit agar* dan *Muller hinton agar*
- 4) Cat Gram

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Identifikasi bakteri *Salmonella Typhi*

Sebelum digunakan dalam penelitian, isolat *Salmonella Typhi* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan pewarnaan Gram, inokulasi pada BSA, dan inokulasi pada TSI (*Tripel Suggar Iron*) agar, dan tes oksidase (Brooks *et al.*, 2007).

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

4.6.1.1 *Bismuth Sulfit Agar (BSA)*

- 1) Dilakukan inokulasi bakteri *Salmonella Typhi* dengan metode *streaking* (penggoresan) pada media *Bismuth Sulfit Agar*
- 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 (*black jet colony*).

4.6.1.2 Pewarnaan Gram bakteri *Salmonella Typhi*

- 1) Dipersiapkan gelas objek dengan cara dibersihkan permukaannya dengan kapas dan kemudian dilewatkan diatas api bunsen beberapa kali, untuk menghilangkan lemak pada gelas objek dan kemudian di dinginkan.

- 2) Ditetaskan satu ose akuades steril dan ditambahkan dengan satu ose sediaan bakteri kemudian disuspensikan
- 3) Dikeringkan sediaan dan difiksasi dengan melewati sediaan diatas 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 sediaan dengan air bersih
- 5) Ditetaskan lugol pada sediaan hingga memenuhi seluruh gelas objek dan didiamkan selama satu menit. Dibuang sisa lugol dan dibilas sediaan 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 dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.
- 10) Hasil positif : tampak mikroskopik *Salmonella* Typhi yaitu isolat bakteri berbentuk batang warna merah (Gram negatif).

4.6.1.3 Penanaman bakteri *Salmonella* Typhi pada agar *Mac Conkey*

Penanaman bakteri *Salmonella* Typhi pada agar *Mac Conkey* dilakukan setelah dilakukan identifikasi dengan pewarnaan Gram dan didapatkan hasil berupa gambaran bakteri bentuk batang dengan Gram negatif. Uji ini dilakukan dengan cara:

- 1) Diambil koloni bakteri *Salmonella* Typhi dengan ose
- 2) Digoreskan pisah secara zig-zag dan renggang pada permukaan media
- 3) Diinkubasi agar berkoloni tersebut selama 18-24 jam pada suhu 37°C
- 4) Hasil positif : didapatkan pertumbuhan *Salmonella* Typhi berbentuk bulat dan tidak berwarna

4.6.1.4 Uji TSI (*Triple Sugar Iron*) *Salmonella* Typhi

- 1) Diambil koloni bakteri *Salmonella* Typhi
- 2) Ditusukkan ose kedalam agar TSI hingga mencapai dasar tabung
- 3) Digoreskan ose secara zig-zag pada permukaan media
- 4) Diinkubasi agar TSI berkoloni tersebut selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan dibaca hasilnya
- 5) Hasil positif : Alkali/asam, H₂S(+), gas (-)

4.6.2 Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan ditanam bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* pada NAP, diinkubasikan 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* dengan konsentrasi garam NaCl 7,5-10% untuk mengetahui sifat fermentasi terhadap manitol, uji katalase, dan uji koagulase.

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

- 1) Diambil isolat bakteri yang telah dipreparasi sebelumnya keatas permukaan gelas objek, kemudian dikeringkan dan dilakukan fiksasi dengan api.
- 2) Ditetesi sediaan dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Dibuang sisa kristal violet dan dibilas dengan air.
- 3) Ditetesi sediaan dengan larutan lugol kemudian ditunggu selama 1 menit. Dibuang sisa lugol dan dibilas dengan air.
- 4) Ditambahkan alkohol 96% keatas sediaan dan dibiarkan selama 5-10 detik. Dibuang sisa alkohol dan dibilas dengan air.
- 5) Dituang safranin diatas sediaan dan dibiarkan selama 30 detik. Dibuang sisa safranin dan dibilas dengan air.
- 6) Dikeringkan sediaan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Dicari adanya sel bakteri bersifat Gram positif, berbentuk kokus dan bergerombol.

4.6.2.2 Penanaman pada media *Manitol Salt Agar* (MSA)

- 1) *Distreaking* bakteri yang akan diuji pada media *Manitol Salt Agar* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah dan diinkubasi selama 24-48 jam.
- 2) Diamati sifat fermentasi manitol dari koloni tersebut berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni *Staphylococcus aureus*.

4.6.2.3 Tes katalase

- 1) Diambil sisa pembenihan cair yang sebagian digunakan untuk tes koagulase pada tabung
- 2) Ditetesi sediaan tersebut dengan larutan H₂O₂ 3%.
- 3) Diperhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Bila ada gelembung udara maka tes katalase positif.

4.6.2.4 Tes koagulase

- 1) Diambil dan dibersihkan gelas objek
- 2) Dibuat suspensi bakteri diatas gelas objek dari satu tetes larutan akuades steril dengan satu koloni kuman dari biakan pada NAP.
- 3) Ditetaskan satu tetes plasma darah pada suspensi bakteri dan dicampur dengan cara menggoyangkan gelas objek dengan arah melingkar dalam waktu 5-10 detik.
- 4) Diamati adanya gumpalan putih (*clumping*) pada sediaan tersebut. Bila tampak gumapalan putih, maka tes koagulase positif.

4.6.3 Persiapan sampel

- 1) Digerus tablet kotrimoksazol 480 mg sampai halus.
- 2) Dimasukkan serbuk kotrimoksazol ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas 100 ml, dikocok hingga homogen sehingga didapatkan larutan kotrimoksazol 25 mg/ml.
- 3) Dari larutan di atas diambil 0,1 ml menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok hingga homogen sehingga didapatkan larutan kotrimoksazol 25 µg/ml.

Rumus pengenceran:

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

$$4800\mu\text{g/ml} \times V1 = 25 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = 2500 \mu\text{g} : 4800\mu\text{g/ml}$$

$$V1 = 0,52 \text{ ml}$$

4.6.4 Persiapan konsentrasi bakteri uji

- 1) Disiapkan tabung-tabung yang diisi dengan NaCl 0,9% sebanyak 1-22 cc. BSA yang berisi bakteri yang sudah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C diambil dengan mikropipet, kemudian dimasukkan kedalam tabung berisi NaCl 0,9% sedikit demi sedikit hingga tepat keruh tujuannya adalah untuk mendapatkan kepadatan bakteri 10⁸ CFU.

4.6.5 Uji Kepekaan Bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus*

- 1) Diambil isolat bakteri kemudian bakteri ditanam pada Bismuth Sulfit Agar. Selanjutnya dilakukan deteksi untuk melihat kadar hambat antimikroba kotrimoksazol generik berlogo dan bermerek terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Metode yang digunakan adalah metode difusi cakram berdasarkan prosedur dari *Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)*.
- 2) Lempeng agar MHA ditandai dengan nama, tanggal, dan bakteri yang akan diuji.
- 3) Dichelupkan kapas lidi steril dalam suspensi biakan uji dengan OD : 0,1 CFU/ml.
- 4) Kemudian diputar kapas lidi pada dinding tabung agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.

- 5) Disebar bakteri pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 90 derajat dan dibuat olesan kedua dengan lempeng agar diputar 45 derajat dan dibuat olesan ketiga untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata kapas lidi.
- 6) Dibiarkan lempeng mengering kurang lebih 5 menit, kemudian ditempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar. Didalam satu lempeng agar dapat digunakan 5 perlakuan dengan jarak antara kertas cakram harus cukup luas, sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang bisa menyulitkan proses pengukuran zona hambatan.
- 7) Ditekan kertas cakram dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena dapat merusak permukaan agar.
- 8) Diinkubasi lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
- 9) Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar, maka zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

4.7 Analisis Data

Data yang diambil berupa diameter hambat antimikroba. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji homogenitas. Bila sebaran data normal dan varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji *Independent t-Test*. Namun jika tidak sama ($p < 0,05$) maka digunakan uji *Mann Whitney*. Taraf kepercayaan yang digunakan adalah 95% ($\alpha = 0,05$).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Alur Penelitian