

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat Eksperimen laboratorium untuk mengetahui kadar hambat minimum enzim lisozim, antibiotik Amoksisilin, dan kombinasi terhadap *Escherichia coli*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah *Escherichia coli* yang telah tersedia di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, yang kemudian diencerkan dari $10^8 \mu\text{l/ml}$ menjadi $10^6 \mu\text{l/ml}$. Dalam penelitian ini akan digunakan strain *Escherichia coli* koleksi laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Mei-Juni 2018 di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar hambat minimum dari Amoksisilin dan kombinasi lisozim dengan Amoksisilin.

2. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah konsentrasi enzim lisozim dan Amoksisilin.

3. Variabel Terkendali

Variabel Terkendali adalah alat dan bahan pada suhu 37°C, strain bakteri uji, umur biakan, konsentrasi bakteri dan durasi inkubasi 18-24 jam.

4. Variabel Tak Terkendali

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

E. Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini adalah:

1. Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang memiliki ciri-ciri mikroskopik batang pendek, susunan tidak teratur, tidak berspora, dan secara makroskopik koloni bulat, permukaan konvek halus, pinggir rata, dan warna pink. Bakteri yang digunakan adalah strain lokal koleksi yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Amoksisilin adalah antibiotik betalaktam yang bekerja dengan cara menghambat dinding sel bakteri. Antibiotik yang digunakan dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Ahmad Dahlan sebanyak (1000 µl/ml).
3. Lisozim adalah enzim yang sudah dibersihkan dari sel yang terdapat pada organisme hidup dan beberapa macam virus (Benkeorioum, 2008). Lisozim yang digunakan berbentuk kristal yang diperoleh dari Laboratorium Universitas

Airlangga Surabaya produksi sigma. Konsentrasi enzim lisozim yang digunakan pada penelitian adalah 300 µg/ml.

4. Kombinasi lisozim dan Amoksisilin adalah campuran antara lisozim 600 µg/ml dengan Amoksisilin 500 µg/ml yang dilakukan dalam penelitian.
5. Kadar hambat minimum adalah konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Instrumen laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: tabung reaksi kecil, tabung reaksi besar, rak tabung, bunsen spritus, alat pelindung diri, inkubator.

2. Bahan penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian adalah: akuades, BHI media, NaCl, agar darah, lisozim, standar McFarland, dan Amoksisilin (500 mg/ml).

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan, berupa persiapan alat dan bahan kemudian sterilisasi semua alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian.
2. Persiapan bakteri uji
 - a. Biakan dari sampel bakteri uji (*Escherichia coli*) ditanam pada media agar miring dari nutrient agar, di inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
 - b. Di ambil 1 koloni dan diinkubasi dalam 2 ml medium cair BHI, lalu diinkubasi selama 2-5 jam pada 37⁰ C atau sampai pertumbuhan bakteri tampak.
 - c. Selanjutnya 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 (Koneman *et al*, 1986; William, 1991).

3. Penentuan kadar hambat minimum Amoksisilin dengan metode pengenceran tabung (William, 1996).
 - a. Larutan antibiotik Amoksisilin dibuat dengan melarutkan 100 mg serbuk Amoksisilin dalam 100 ml larutan akuades, 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 mikrogram pada homogen, diambil 1 ml campuran larutan tersebut dimasukkan kedalam tabung ke-3. 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 37⁰ C selama 24 jam.
- g. Kadar hambat minimal akan ditunjukkan dengan tidak timbulnya kekeruhan pada konsentrasi terendah atau tabung yang memperlihatkan bening pertama pada deretan tabung menunjukkan kadar hambat minimal dari antibiotik tadi.

4. Penentuan kadar hambat minimal lisozim

- a. Larutan lisozim dibuat dengan melarutkan 60 mg serbuk kristal lisozim dalam 100 ml larutan akuades, sehingga diperoleh konsentrasi 600 ug/ml.
- b. Disediakan 15 tabung volume 5 ml steril, dimasukkan 1 ml akuades mulai tabung ke-2 sampai tabung ke-15 kecuali tabung ke-14. Selanjutnya dimasukkan pula 1 ml larutan lisozim dengan konsentrasi 600 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 10⁶ 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 kadar hambat minimal dari lisozim tadi.

5. Penentuan kadar hambat minimal lisozim dan Amoksisilin.

- a. Dibuat seri pengenceran larutan Amoksisilin seperti di atas (no.3).
- b. Kedalam masing-masing tabung dari tabung ke-1 sampai tabung ke-14, dimasukkan 1ml suspensi lisozim 600 mg serbuk lisozim yang dilarutkan dalam 100 ml akuades 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 control sterilitas bahan (kontrol negatif). Tabung ke-15 mengandung bakteri dalam medium BHI sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri.
- d. Konsentrasi akhir Amoksisilin setelah dikombinasikan dengan 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 kadar hambat minimal dari lisozim tadi.

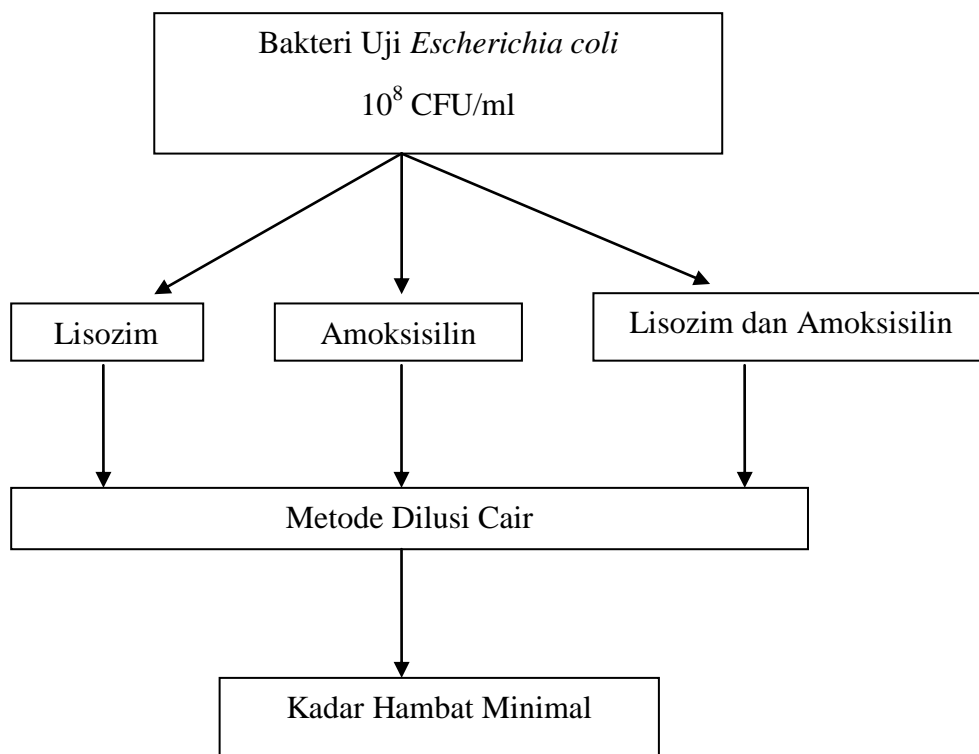
H. Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk penelitian ini adalah uji T berpasangan (Al-Rasyi, 1994 dalam Suryani, 2000), untuk membandingkan nilai kadar hambat minimal Amoksisilin dengan kombinasi lisozim terhadap bakteri *Escherichia coli*.

I. Etik Penelitian

Penelitian ini sudah mendapat izin dari komite etik Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan nomor: 642/EP-FKIK-UMY/XII/2017.

J. Alur Penelitian



Gambar 5 Alur Penelitian