

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Eschericia coli* hasil isolasi air susu sapi perah mastitis di daerah Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang terdapat di air susu sapi perah mastitis di daerah Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013 yang diambil secara acak dari medium selektif dan differensial hasil isolasi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah adanya bakteri *Escherichia coli* penyebab penyakit mastitis pada sapi perah di daerah Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013.

Variabel utama kedua adalah uji sensitivitas antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin terhadap *Escherichia coli*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *Eschericia coli* hasil isolasi dari air susu sapi perah mastitis yang akan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel air susu, kondisi laboratorium, kondisi percobaan.

Variabel tergantung adalah akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah daya hambat cakram antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* hasil isolasi dari air susu sapi perah mastitis.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, air susu adalah air susu sapi perah mastitis yang diperoleh dari peternak sapi perah di Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013.

Kedua, *Escherhicia coli* adalah bakteri *Escherhicia coli* yang didapat dari isolasi air susu sapi perah mastitis yang diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan biokimia.

Ketiga, cakram antibiotik penisilin G adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia penisilin G dengan dosis 10 U yang didapat dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Keempat, cakram antibiotik tetrasiklin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia tetrasiklin dengan dosis 30 µg yang didapat dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Kelima, cakram antibiotik eritromisin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia eritromisin dengan dosis 15 µg yang didapat dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Keenam, cakram antibiotik siprofloksasin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia siprofloksasin dengan dosis 5 µg yang didapat dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Ketujuh, uji sensitivitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kepekaan bakteri *Escherhicia coli* hasil isolasi air susu sapi perah mastitis di Boyolali terhadap antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin dengan mengukur diameter hambat kemudian dibandingkan dengan tabel *Interperative Standard Kirby Bauer* untuk mengetahui pola kepekaanya yang terbagi dalam resisten, *intermediate*, *moderately susceptible*, dan *susceptible*.

Kedelapan, resisten adalah mengindikasikan kuman yang tidak bisa di hambat oleh antibiotik, dalam kadar yang biasanya cukup untuk menghambat kuman tersebut.

Kesembilan, *intermediate* adalah mengindikasikan kuman dengan KHM antibiotik yang kadarnya kurang lebih sama, dengan kadar dalam darah atau jaringan sehingga responnya lebih rendah dari isolat kuman yang peka.

Kesepuluh, hasil *moderately susceptible* adalah kuman yang infeksiya dapat diatasi dengan dosis aman maksimal untuk terapi strain bakteri dengan hasil *moderately susceptible* dikategorikan sebagai *sensitive* bukan *intermediate*.

Kesebelas, *susceptible* adalah mengindikasikan kuman yang bisa di hambat oleh antibiotik, dalam kadar yang biasanya untuk menghambat kuman tersebut.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk mengambil sampel adalah tabung reaksi. Alat yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, inkas, kapas lidi steril, jarum ose, lampu spiritus, pinset, deglass, objek glass, mikroskop, inkubator.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Eschericia coli* yang didapat dari isolasi air susu sapi perah mastitis di Boyolali.

2.2. Bahan media. Bahan media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Endo Agar digunakan untuk menangkap atau menumbuhkan bakteri. Brain Heart Infusion (BHI), digunakan untuk membuat suspensi bakteri. Media Sulfida Indol Motility (SIM), Klinger Iron Agar (KIA), Lysin Iron Agar (LIA) dan Citrat digunakan untuk identifikasi bakteri. Mueller Hinton Agar (MHA), digunakan untuk uji sensitivitas antibiotik.

2.3. Bahan Cakram Antibiotik. Cakram Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cakram antibiotik penisilin G dengan dosis 10 U, tetrasiklin dengan dosis 30 µg, dengan dosis eritromisin 15µg, dan dengan dosis siprofloksasin 5µg.

D. Jalannya Penelitian

1. Persiapan alat dan bahan

2.4. Media agar yang digunakan yaitu Endo Agar (EA), Mueller Hinton Agar (MHA), Brain Heart Infusion (BHI), media Sulfida Indol Motility (SIM), Kligler's Iron Agar (KIA), media Lysin Iron Agar (LIA), dan media Citrat, pembuatan dilakukan sesuai dengan prosedur masing-masing media, kemudian di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 1,5-2 jam. Cakram antibiotik yang digunakan yaitu cakram antibiotik penisilin G dengan dosis 10 U, tetrasiklin dengan dosis 30 µg, dengan dosis eritromisin 15µg, dan dengan dosis siprofloksasin 5µg.

Alat-alat yang berasal dari gelas seperti cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan cara pemanasan menggunakan oven pada suhu 180° C selama 2 jam. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu spiritus.

2. Pengambilan bakteri

Pengambilan sampel dari air susu sapi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Buffered Pepton Water, agar bakteri tidak mati selama proses transportasi, dan selama proses transportasi sampel dimasukkan ke dalam termos

es. Sampel kemudian disentrifugasi. Sampel air susu kemudian ditanam pada media Endo agar (EA) dengan cara digores, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

3. Identifikasi bakteri uji

3.1. Identifikasi bakteri.

3.1.1. Makroskopis. Suspensi *Escherichia coli* diinokulasi pada media Endo Agar (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, akan memberikan hasil yaitu beberapa koloni dengan logam berkilau yang permanen dan warna medium merah violet.

3.1.2. Mikroskopis. Koloni bakteri *Escherichia coli* dicat Gram. Pertama, siapkan obyek glass untuk pembuatan preparat bakteri *Escherichia coli* dengan teknik smear. Bagian tengah obyek glass ditetesi dengan aquadest, dan ditambah sedikit biakan bakteri *Escherichia coli*, kemudian dilakukan perataan. Preparat yang sudah jadi diviksasi diatas lampu spiritus. Kedua, tetesi bagian yang dismear dengan cat Gram A, diamkan 1-2 menit, kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Ketiga, tetesi dengan cat Gram B, diamkan 1-2 menit, dibilas. Keempat, tetesi dengan cat Gram C, diamkan 1-2 menit, dibilas dan dikeringkan. Kelima, tetesi dengan cat Gram D, diamkan 1-2 menit, bilas dan dikeringkan. Amati dengan mikroskop, akan menunjukkan hasil yang positif jika terlihat berwarna merah yang menunjukkan bakteri Gram negatif.

3.1.3. Identifikasi bakteri uji dengan uji Biokimiawi. Uji biokimiawi untuk *Escherichia coli* isolat air susu sapi perah pada media Sulfida Indol Motility (SIM), biakan murni diinokulasikan pada permukaan media dengan cara tusukan

kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida, indol dan motilitas. Positif Sulfida bila memberikan warna merah setelah diberi reagen Ehrlich. Positif untuk uji motilitas apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

Uji biokimiawi *Escherichia coli* pada media Kligler's Iron Agar (KIA), biakan bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui fermentasi karbohidrat, ada atau tidaknya sulfida, bila bagian lereng berwarna merah maka ditulis K, bila bagian dasar berwarna kuning maka ditulis A, bila medium pecah atau terangkat keatas dapat disimpulkan bahwa adanya gas maka ditulis G (+) dan bila terbentuk warna hitam ditulis S(+).

Uji biokimiawi *Escherichia coli* pada media Lysin Iron Agar (LIA), inokulasi bakteri dilakukan dengan cara ditusukkan dan digoreskan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui deaminasi lysin dan sulfida. Bagian lereng merah coklat maka ditulis R, jika berwarna ungu ditulis K, jika kuning ditulis A, medium berwarna hitam ditulis S(+), jika tidak hitam ditulis S(-).

Uji biokimiawi *Escherichia coli* pada media Citrat, bakteri diinokulasi dengan cara menggoreskan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk meneliti kemampuan bakteri menggunakan Citrat sebagai sumber karbon. Reaksi positif bila berwarna biru.

4. Pembuatan suspensi bakteri

Isolat bakteri dari media Endo Agar (EA) diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam dalam tabung yang berisi media Brain Heart Infusion (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan Standard Mac Farland 0,5 dengan jumlah sel sama dengan 10^8 CFU/ml. Kemudian diinkubasi selama 4-6 jam.

5. Uji sensitivitas antibiotik dengan media Muller Hinton Agar

Pengujian dilakukan secara difusi dengan cakram Kirby Bauer. Pertama, medium Mueller Hilton Agar (MHA) yang telah dicairkan dituangkan kedalam petri steril dan ditunggu hingga memadat. Kedua, kapas lidi steril dimasukkan kedalam medium Brain Heart Infusion (BHI) yang mengandung biakan bakteri *Eschericia coli* kemudian diinokulasi ke dalam medium Muller Hinton Agar (MHA) dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar, agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Cakram antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin diletakkan pada media Muller Hinton Agar (MHA) dengan jarak yang sama. Ketiga, media Muller Hinton Agar (MHA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar cakram diukur, dinyatakan dalam satuan mm. Keempat, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

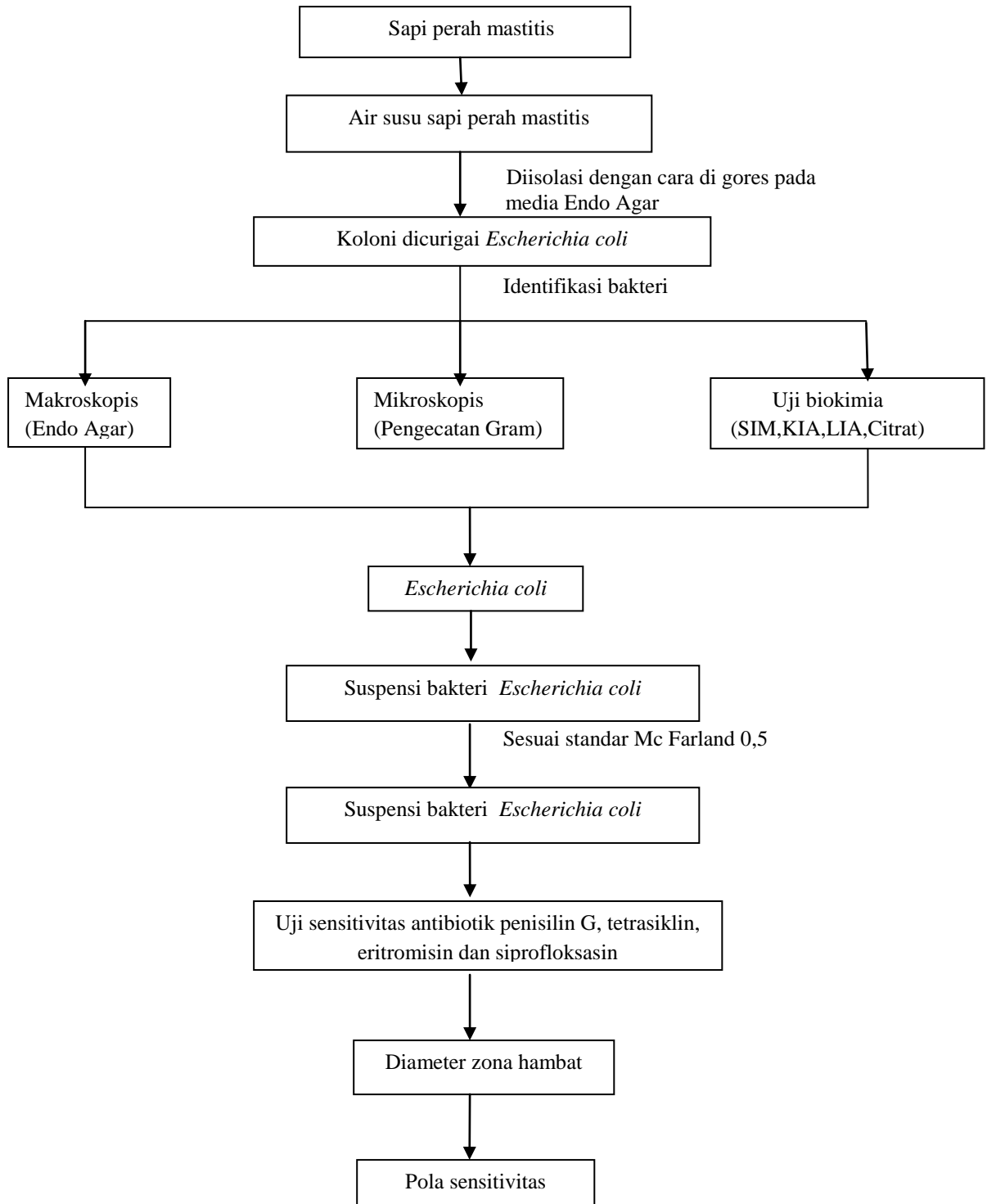
E. Analisis Data

Data yang didapat pada uji kepekaan antibiotik penisilin G, tetrasiklin, eritromisin dan siprofloksasin terhadap bakteri *Escherichia coli* dari hasil isolasi air susu sapi perah mastitis di Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013 dianalisis dengan pengujian distribusi normal (Kolmogorov-Smirnov), jika data

tidak terdistribusi normal ($<0,05$) dilanjutkan dengan uji non parametrik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($>0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA). Pengujian statistik pada penelitian ini yang sesuai yaitu Kruskal-Wallis, karena data tidak terdistribusi normal lalu dilanjutkan uji Mann-Whitney.

Pengujian statistik untuk mengetahui perbedaan yang nyata antara uji kepekaan pada bakteri *Escherichia coli* dari hasil isolasi air susu sapi perah mastitis di Boyolali pada bulan Februari-April tahun 2013 dan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan uji distribusi normal. Data yang terditribusi normal dilanjutkan uji T dan data yang tidak terdistribusi normal dilakukan uji Kruskal-Wallis.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema jalannya penelitian secara sistematis.