

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan metode *True Experimental* dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group*. Metode pengujian akan menggunakan metode Dilusi Kaldu (*Broth Dilution Test*) untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada pengaruh pemberian Cuka Apel (*Apple Cider Vinegar*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *In Vitro*.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan Juni 2023.

#### 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.3.1 Populasi Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan populasi biakan bakteri murni *Klebsiella pneumoniae* milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

##### 4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah biakan bakteri murni *Klebsiella Pneumoniae* dengan pengambilan sampel secara *Simple*

*Random Sampling*. Teknik pengambilan ini dilakukan karena populasi biakan tiap unitnya bersifat homogen.

### 4.3.3 Estimasi Jumlah Pengulangan

Penelitian ini akan melakukan uji pada 7 kelompok yang terdiri dari, 5 kelompok uji, 1 kelompok kontrol positif (bahan), dan 1 kelompok kontrol negatif (bakteri).

Berdasarkan Rumus Federer yang menyatakan  $t$  sebagai jumlah perlakuan dan  $r$  sebagai banyaknya pengulangan, maka diketahui :

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

$$(r-1)(7-1) \geq 15$$

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

$$6r-6 \geq 15$$

$$6r \geq 15+6$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3.5 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan rumus tersebut dengan diambil jumlah maksimum, maka perlu dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali (Prihanti, 2016).

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel Bebas Penelitian ini adalah Cuka Apel (*Apple Cider Vinegar*) dengan konsentrasi 100% (kontrol positif bahan), 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, dan 0% (kontrol negatif bakteri).

##### 4.4.2 Variabel Terikat Penelitian

Variabel Terikat Penelitian ini adalah pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara In Vitro yang diketahui melalui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

##### 4.4.3 Variabel Kontrol Penelitian

Variabel Kontrol Penelitian ini adalah media pembiakan yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

#### 4.5 Definisi Operasional

**Tabel 4.1 Definisi Operasional**

No.	Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala Ukur
1.	Cuka Apel ( <i>Apple Cider Vinegar</i> ) <i>Malus</i>	Cuka Apel ( <i>Apple Cider Vinegar</i> ) merupakan bahan olahan	Mengukur jumlah dengan Mikropipet	Konsentrasi : 1. 100% (Kontrol Positif) 2. 50%	Kategorik : Ordinal

	<i>domestica</i>	hasil fermentasi dari buah apel		3. 25% 4. 12,5% 5. 6,25% 6. 3,125% 7. 0% (Kontrol Negatif)	
2.	Kadar Hambat Minimum (KHM)	Konsentrasi minimal Cuka Apel ( <i>Apple Cider Vinegar</i> ) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> dengan mengamati tingkat kekeruhan media pertumbuhan di tabung reaksi	Penilaian secara visual menggunakan kertas garis indikator kekeruhan	Jernih (+) : Garis Hitam pada Kertas Indikator yang ditampakan dari belakang tabung reaksi terlihat jelas.  Keruh (-) : Apabila Garis Hitam pada Kertas Indikator yang ditampakan dari belakang tabung reaksi tidak terlihat jelas atau kekeruhan tabung sama dengan pada 0% (Kontrol	Kategorik : Ordinal

				Negatif)	
3.	Kadar Bunuh Minimum (KBM)	Konsentrasi minimal Cuka Apel ( <i>Apple Cider Vinegar</i> ) yang dapat membunuh 99.9% pertumbuhan bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> berdasarkan kontrol bakteri yang diketahui melalui <i>Colony Counter</i>	Perhitungan jumlah koloni bakteri menggunakan <i>Colony Counter</i>	Pertumbuhan bakteri yang dihitung berdasarkan jumlah koloni tidak melebihi 0.1% dari kontrol bakteri atau tidak ditemukan koloni sama sekali.	Kategorik : Ordinal

#### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Media *Nutrient Broth* (MHB)

Alat :

1. Tabung Erlenmeyer
2. Tabung Reaksi Steril
3. Gelas Ukur
4. Spuit Steril

5. Kertas Aluminium
6. Neraca Analitik
7. *Vortex Mixer*
8. *Magnetic Stirrer*
9. *Microwave*
10. Autoklaf

Bahan :

1. Bubuk Media *Mueller-Hinton Broth* (MHB)
2. Aquades

#### **4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Media Nutrient Agar (MHA)**

Alat :

1. Tabung Erlenmeyer
2. Cawan Petri Steril
3. Gelas Ukur
4. Kertas Aluminium
5. Neraca Analitik
6. *Magnetic Stirrer*
7. *Microwave*
8. Autoklaf

Bahan :

1. Bubuk Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)
2. Aquades

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Pembuatan Pembenuhan Bakteri

Alat :

1. Spuit Steril
2. Tabung Reaksi Steril
3. Kertas Aluminium
4. Ose
5. Api Bunsen

Bahan :

1. Pembenuhan Murni bakteri *Klebsiella pneumoniae*
2. NaCl Fisiologis

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Uji KHM dan KBM

Alat :

1. Inkubator
2. Rak Tabung Reaksi
3. *Colony Counter*

Bahan :

1. Cuka Apel

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi Alat dilakukan pada peralatan yang digunakan untuk wadah media pertumbuhan bakteri, yakni : tabung erlenmeyer, tabung reaksi, dan cawan petri. Sterilisasi dilakukan di

dalam mesin autoklaf dengan suhu 121°C, dalam tekanan 15 atm, selama 15 menit. Peralatan lain akan dilakukan teknik aseptik melalui pencucian dengan sabun yang kemudian dikeringkan.

#### **4.7.2 Pembuatan Media *Mueller-Hinton Broth* (MHB)**

1. Media MHB ditimbang sejumlah 0,29 gram yang kemudian akan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dan ditambahkan aquades sejumlah 14 ml.
2. Media MHB diaduk hingga homogen.
3. Media MHB dimasukkan ke dalam autoklaf untuk menjalani proses sterilisasi dengan suhu 121°C, dalam tekanan 15 atm, selama 15 menit.
4. Media MHB yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang dibutuhkan.

#### **4.7.3 Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)**

1. Media MHA ditimbang sejumlah 21,3 gram yang kemudian akan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dan ditambahkan aquades sejumlah 560 ml.
2. Media MHA diaduk hingga homogen.
3. Media MHA dimasukkan ke dalam *microwave* untuk dipanaskan hingga mendidih.



4. Media MHA kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf untuk menjalani proses sterilisasi dengan suhu 121°C, dalam tekanan 15 atm, selama 15 menit.
5. Media MHA yang sudah steril dituangkan ke masing-masing cawan petri yang dibutuhkan sebanyak 20 ml.

#### 4.7.4 Pembuatan Pembenuhan bakteri *K. pneumoniae*

Kepadatan pembenuhan yang akan digunakan dalam penelitian sesuai dengan yang disarankan oleh *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) dalam teknik dilusi adalah  $10^5$  bakteri/ml (Balouiri et al., 2016). Pembuatan kepadatan tersebut dilakukan dengan :

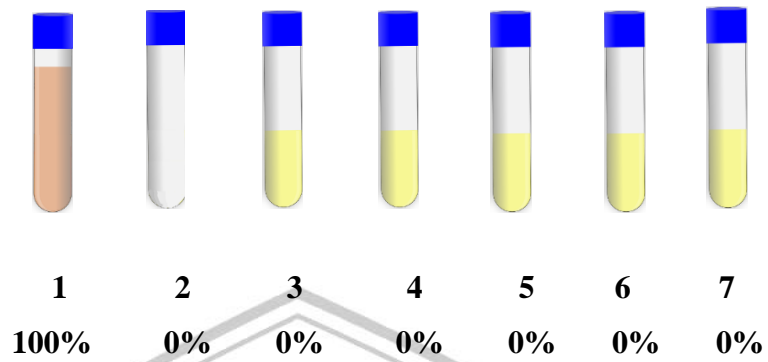
1. Mengambil sejumlah ose dari koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*, yang kemudian diinokulasikan ke dalam tabung yang telah terisi NaCl Fisiologis, kemudian dihomogenkan. Kekeruhan tabung tersebut disetarakan dengan standar *McFarland I*, yang setara  $10^8$ .
2. Setelah itu, 1ml suspensi bakteri  $10^8$  bakteri/ml, diinokulasikan ke dalam 9ml NaCl Fisiologis, sehingga suspensi bakteri mengalami pengurangan  $10^{-1}$ , dan menjadi  $10^7$  bakteri/ml. Pemindahan ini dilakukan hingga didapatkan kepadatan  $10^5$  bakteri/ml.

#### 4.7.5 Uji Pengaruh Pemberian Cuka Apel (*Apple Cider Vinegar*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Penelitian ini dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui kepekaan yang didapat berdasarkan KHM dan KBM dari pengaruh pemberian Cuka Apel. Tabung yang digunakan sejumlah 7 dengan masing-masing berkonsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, dan 0% cuka apel. Kemudian diinokulasikan bakteri dari pembenihan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan semua tabung diinkubasikan selama 20 jam dalam suhu 35°C. Berikut adalah tahap-tahapan pada pengujiannya :

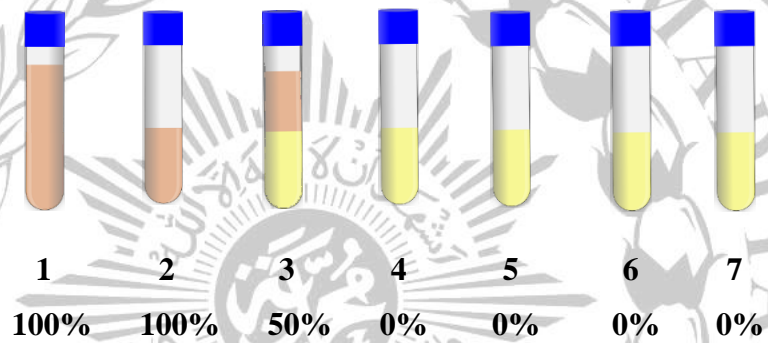
##### Hari Pertama

1. 7 Tabung Steril yang terdiri dari : Tabung 1, Tabung 2, Tabung 3, Tabung 4, Tabung 5, Tabung 6, dan Tabung 7. Kelima tabung untuk perlakuan berbagai konsentrasi cuka Apel. Tabung 1 (100%) sebagai kontrol positif bahan dan tabung 7 (0%) sebagai kontrol negatif bakteri. 5 tabung lainnya secara berurutan untuk 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, dan 3.125%
2. Media MHB sebanyak 0.5ml diisikan ke dalam tabung 3, 4, 5, 6, dan 7. Tabung 1 diisi dengan 1ml Cuka Apel murni (100%).



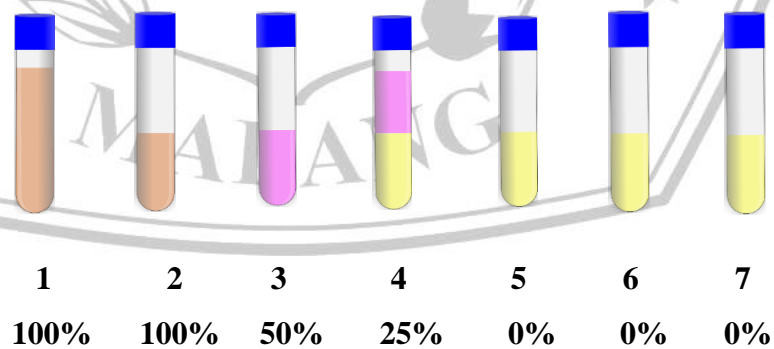
**Gambar 4.1 Pengisian awal tabung uji.**

3. Tabung 2 dan 3 diisi Cuka Apel murni (100%) 0,5 ml, kemudian tabung 3 diaduk hingga homogen.



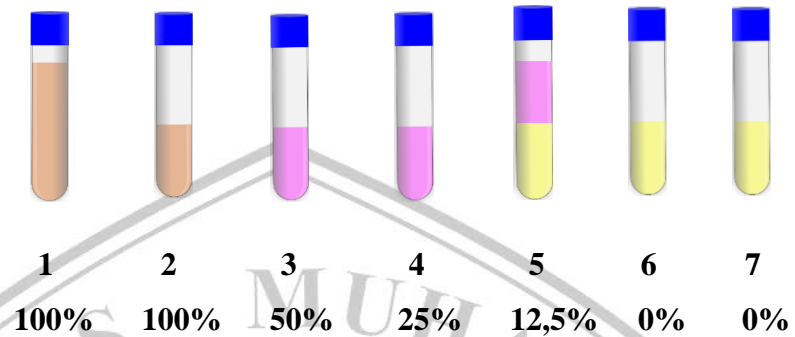
**Gambar 4.2 Pengenceran cuka apel pada tabung 3.**

4. 0.5 ml larutan dari tabung 3 diambil dan diisi ke tabung 4, kemudian tabung 4 diaduk hingga homogen.



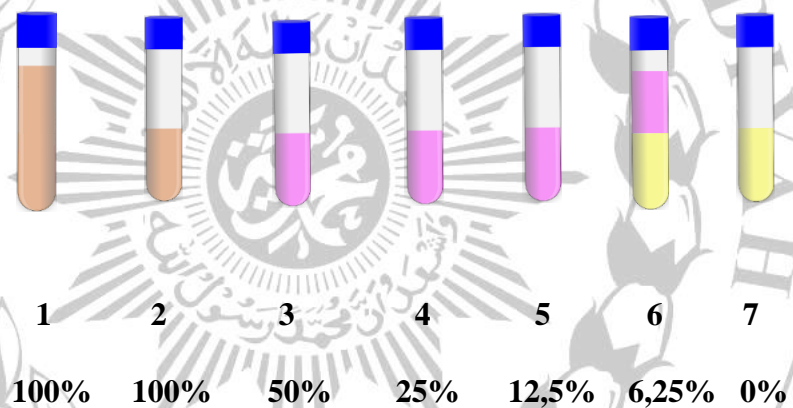
**Gambar 4.3 Pengenceran cuka apel pada tabung 4.**

5. 0.5 ml larutan dari tabung 4 kemudian diambil dan diisikan ke tabung, 5, kemudian tabung 5 diaduk hingga homogen.



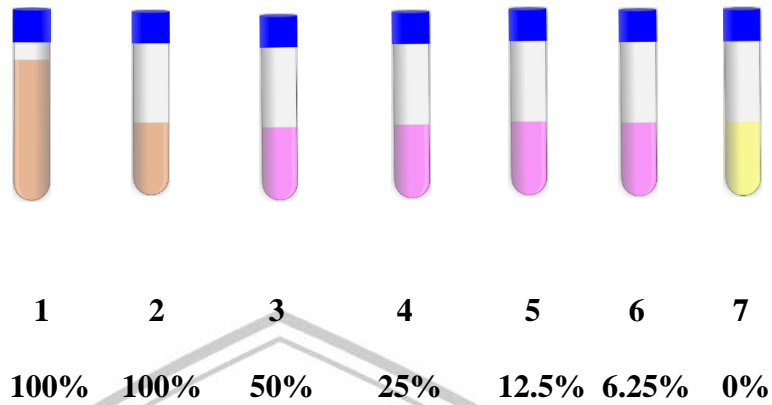
**Gambar 4.4 Pengenceran cuka apel pada tabung 5.**

6. 0.5 ml larutan dari tabung 5 kemudian diambil dan diisikan ke tabung, 6, kemudian tabung 6 diaduk hingga homogen,



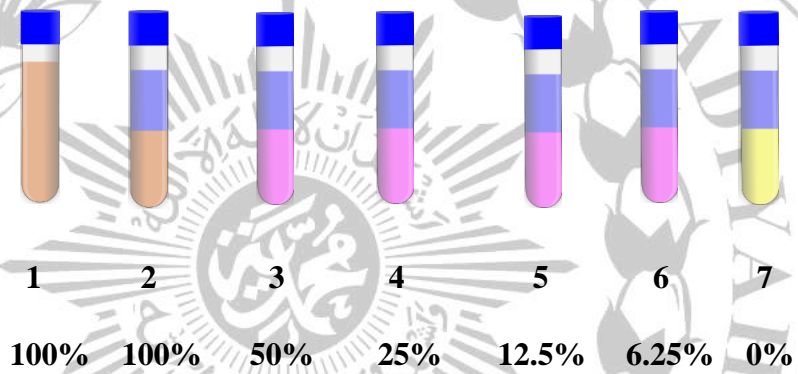
**Gambar 4.5 Pengenceran cuka apel pada tabung 6.**

7. 0.5 ml larutan kemudian dibuang dari tabung 6. Konsentrasi awal kemudian didapatkan.



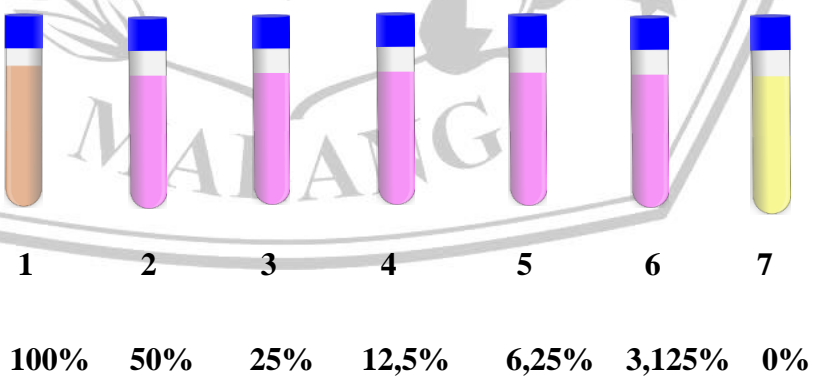
**Gambar 4.6 Penyisihan sisa larutan pada tabung 6.**

8. Tabung 2 hingga 7 kemudian diinokulasikan 0,5 ml suspensi bakteri.



**Gambar 4.7 Penambahan inokulasi suspensi bakteri.**

9. Kemudian didapatkan konsentrasi akhir dari semua tabung.



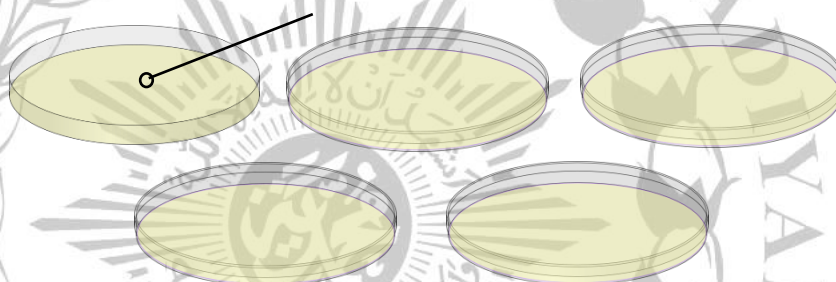
**Gambar 4.8 Konsentrasi akhir dari semua tabung.**

10. Semua tabung diinkubasi selama 20 jam dalam suhu 35°C.

### Hari Kedua

Tabung-tabung yang telah diinkubasi selanjutnya dikeluarkan dari inkubator dan diamati tingkat kekeruhannya menggunakan kertas indikator bergaris hitam yang kemudian didapatkan nilai KHM.

Selanjutnya, diambil sub-sampel dari seluruh tabung sebanyak 1 kali dan dilakukan *Streak Plate* pada media MHA yang telah disiapkan untuk masing-masing tabung. Kemudian, semua cawan media MHA diinkubasi selama 20 jam dalam suhu 35°C.

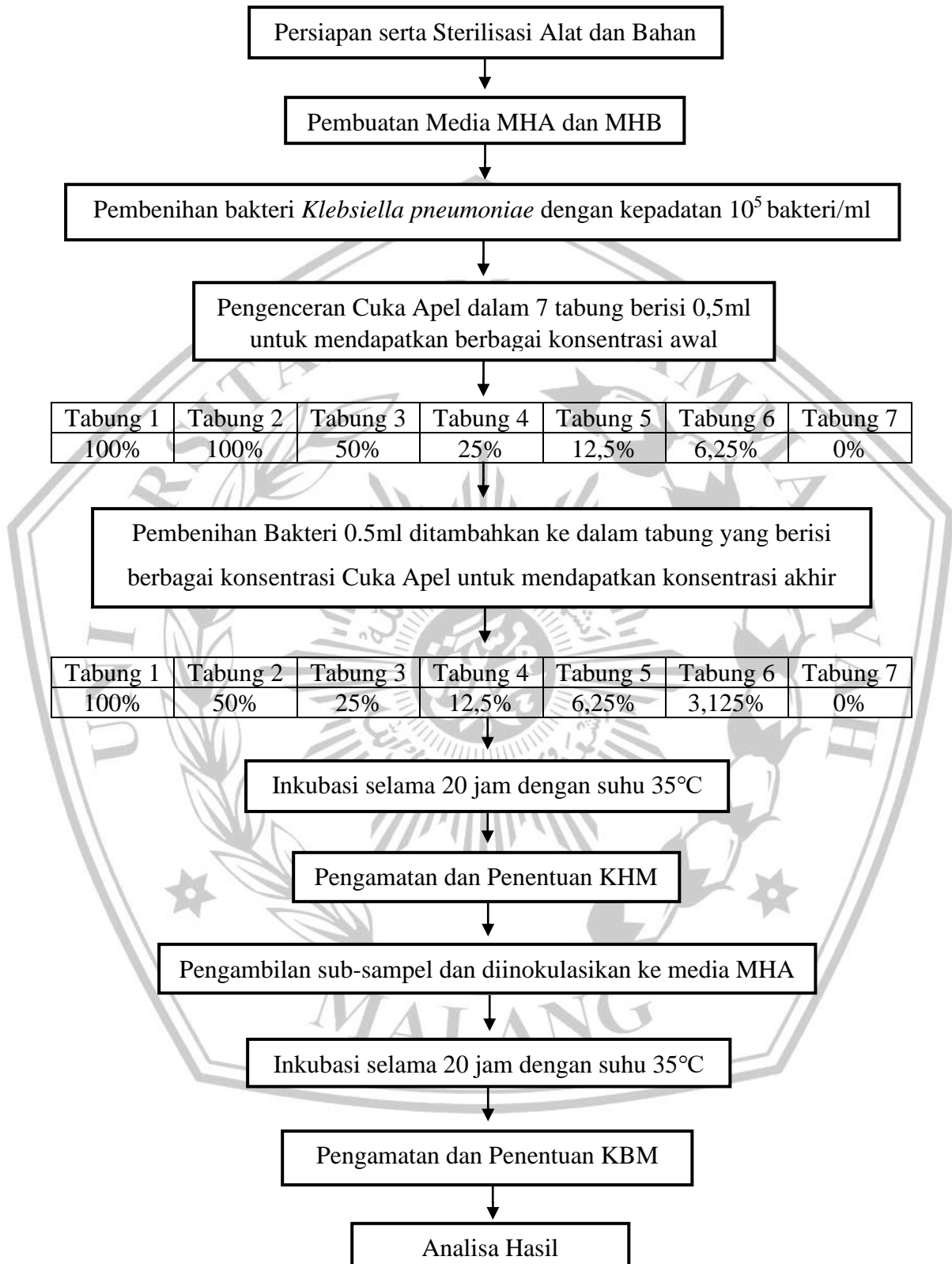


**Gambar 4.9 *Streaking* pada cawan MHA.**

### Hari Ketiga

Semua cawan media MHA kemudian dikeluarkan dari inkubator dan dilakukan perhitungan jumlah koloni yang berhasil bertahan dan bertumbuh menggunakan *Colony Counter*. KBM dapat ditentukan setelah ditemukannya konsentrasi yang sesuai kriteria KBM. Penelitian ini dilakukan oleh peneliti dan dikonfirmasi oleh analis laboratorium.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.10 Skema Prosedur Penelitian



#### 4.9 Analisa Data

Analisa Data untuk penelitian ini menggunakan metode statistik *Chi Square*. Berikut penjelasan metode analisa :

1. Dengan uji *Chi Square* untuk membuktikan adanya perbedaan proporsi dari setiap kelompok perlakuan. Dikatakan terdapat perbedaan apabila hasil  $p < 0,05$ .

