



**EFEK KOMBINASI VANKOMISIN DAN MADU TERHADAP
PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh
Aisyah Pratiwi Maharini
NIM 132010101016

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**EFEK KOMBINASI VANKOMISIN DAN MADU TERHADAP
PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

oleh

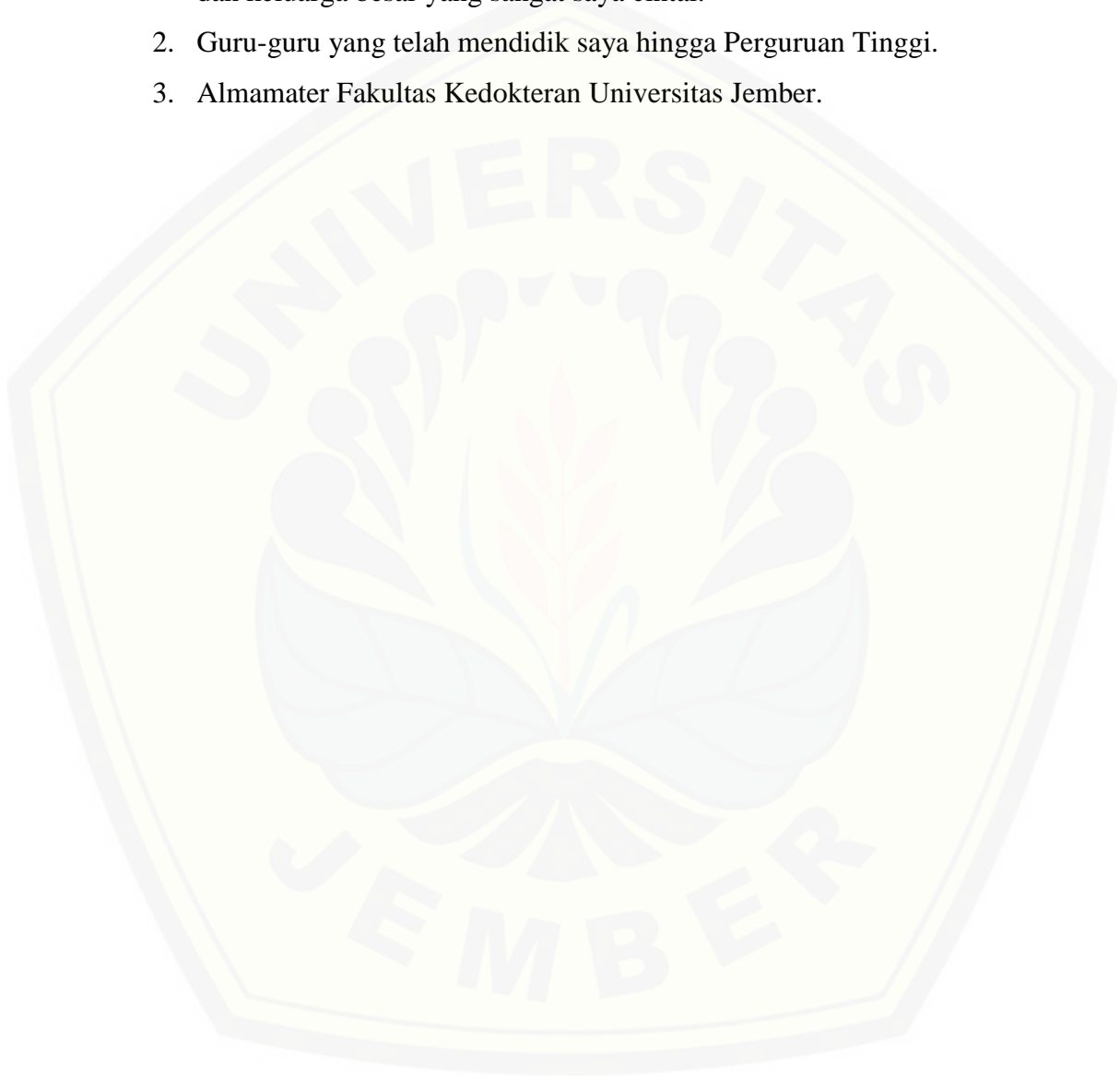
Aisyah Pratiwi Maharini
NIM 132010101016

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Zaenudin beserta Ibu Trisnani Susilowati dan keluarga besar yang sangat saya cintai.
2. Guru-guru yang telah mendidik saya hingga Perguruan Tinggi.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

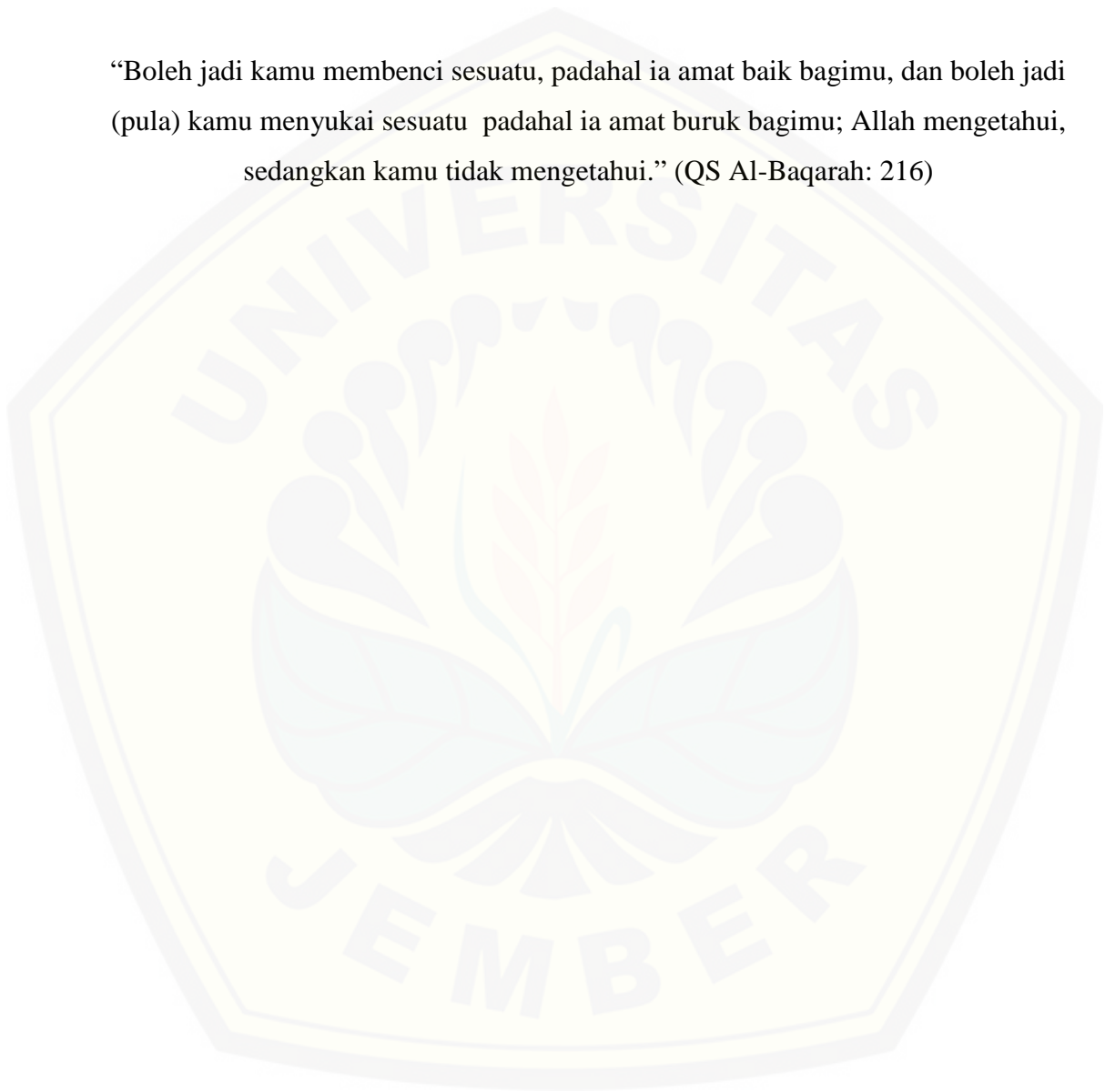


MOTO

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”

(QS Alam Nashrah: 5)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedangkan kamu tidak mengetahui.” (QS Al-Baqarah: 216)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Aisyah Pratiwi Maharini

NIM : 132010101016

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Vankomisin dan Madu Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*” merupakan hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juni 2017

Yang menyatakan,

Aisyah Pratiwi Maharini
NIM 132010101016

SKRIPSI

**EFEK KOMBINASI VANKOMISIN DAN MADU TERHADAP
PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO**

Oleh

Aisyah Pratiwi Maharini
NIM 1320101016

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Enny Suswati, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Cicih Komariah, Sp.M

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Kombinasi Vankomisin dan Madu Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*” karya Aisyah Pratiwi Maharini telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 19 Juni 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP. 197304241999031002

dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A
NIP. 197706252005011002

Anggota II,

Anggota III,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP.197002141999032001

dr. Cicih Komariah, Sp.M
NIP.197409282005012001

Mengesahkan,
Dekan

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP. 197002141999032001

RINGKASAN

Efek Kombinasi Vankomisin dan Madu Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*; Aisyah Pratiwi Maharini; 132010101016; 51 halaman; 2017; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan flora normal yang mampu menjadi patogen dan menyebabkan infeksi lokal hingga sistemik. Prevalensi infeksi akibat *S.aureus* di dunia mencapai 10 sampai 30 kasus per 100.000 orang per tahunnya. Salah satu antimikroba untuk mengobati infeksi serius akibat *S.aureus* adalah vankomisin. Namun kepekaan *S.aureus* terhadap vankomisin semakin menurun terbukti dengan ditemukannya 10 isolat *Vancomycin resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) di Rumah Sakit Margono Soekarjo Purwokerto. Sama halnya di RSUP Mohammad Hoesin Palembang dari 1118 isolat *S.aureus*, 19 isolat atau 1,7% diantaranya merupakan VRSA dan 1 isolat atau 0,1 % merupakan *Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus* (VISA).

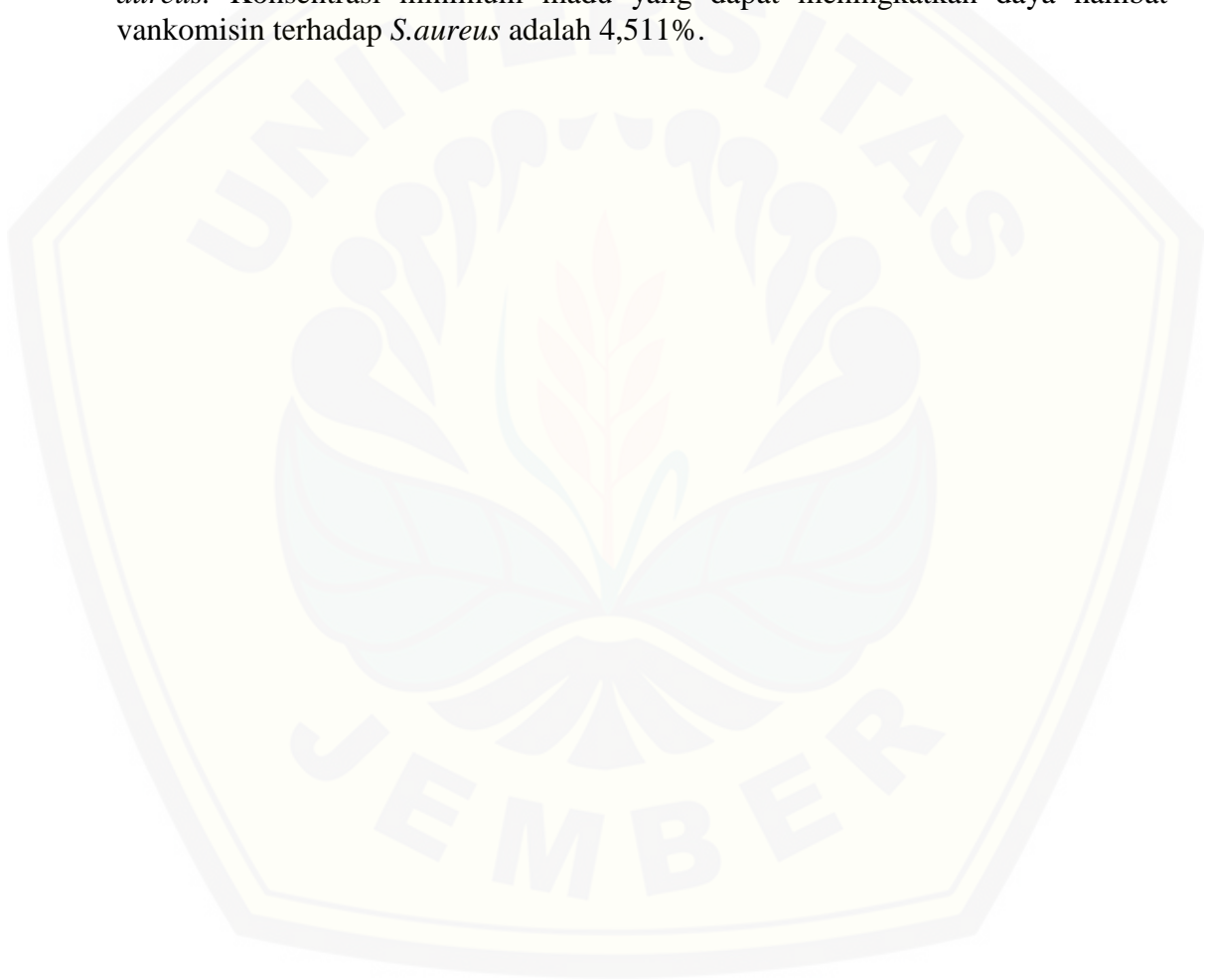
Untuk mencegah timbulnya resistensi diperlukan kombinasi antimikroba yang memiliki mekanisme berbeda. Salah satu upaya mencegah resistensi vankomisin yaitu dengan mengkombinasikannya dengan madu. Kandungan peroksida madu yaitu hidrogen peroksida memiliki kemampuan untuk meningkatkan stres oksidatif pada bakteri sehingga terjadi degradasi DNA. Selain itu madu mengandung senyawa fenol, flavonoid dan alkaloid yang dapat menyebabkan pemutusan lapisan peptidoglikan yang menjadi pelindung bagi bakteri. Madu juga memiliki osmolaritas yang tinggi sehingga bakteri akan mengalami dehidrasi karena kekurangan cairan dan pada akhirnya akan mati. Selain itu madu memiliki nilai pH yang rendah yang tidak mendukung lingkungan hidup untuk bakteri.

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental* secara *in vitro* dengan desain penelitian *post test only control group design* dengan metode mikrodilusi. Sampel terdiri dari satu kelompok kontrol negatif (K-) dan tujuh kelompok perlakuan (P1-P7). Kelompok kontrol negatif diisi dengan 75 $\mu\text{l/well}$ MHB yang tersuspensi bakteri dan 75 $\mu\text{l/well}$ vankomisin. Semua kelompok perlakuan diisi dengan 50 $\mu\text{l/well}$ media MHB yang tersuspensi dengan bakteri dan 50 $\mu\text{l/well}$ vankomisin 2 $\mu\text{g/mL}$. Pada kelompok P1-P7 ditambahkan madu dengan konsentrasi masing-masing P1=1,25%, P2= 2,5%, P3=5% , P4=10%, P5=20% ,P6=40%, dan P7=80% masing-masing 50 $\mu\text{l/well}$. *Microplate* kemudian diinkubasi dengan suhu 37⁰C selama 24 jam kemudian selanjutnya dilakukan pembacaan dengan menggunakan *microplate reader*.

Data yang diperoleh berupa *optical density* (OD) kemudian diuji normalitas dan homogenitas. Data yang diperoleh normal dan homogen kemudian dilanjutkan Uji *One Way ANOVA*. Pada Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) artinya terdapat minimal dua kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna. Kemudian dilanjutkan Uji *Least Significance Different* (LSD) untuk menentukan kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan uji LSD kelompok kontrol negatif (K-) berbeda signifikan dengan kelompok P1-P7. Nilai persentase peningkatan daya hambat kelompok perlakuan

kemudian diuji dengan menggunakan uji korelasi *pearson*. Uji korelasi *pearson* menunjukkan signifikansi 0,000 ($p < 0,01$) artinya konsentrasi madu signifikan berpengaruh terhadap besar OD. Hasil persentase peningkatan daya hambat diuji dengan uji regresi linear untuk menentukan konsentrasi minimum madu yang mampu meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap pertumbuhan *S.aureus*. Dari persamaan uji regresi linear didapatkan konsentrasi minimum 4,511 %.

Hasil penelitian menunjukkan semakin besar konsentrasi madu yang diberikan maka OD akan semakin kecil. OD yang kecil menghasilkan peningkatan persentase daya hambat vankomisin yang semakin besar. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara kombinasi vankomisin dan madu dengan vankomisin tunggal terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Konsentrasi minimum madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap *S.aureus* adalah 4,511%.



PRAKATA

Puji syukur atas segala nikmat dan karunia Allah SWT sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul “Efek Kombinasi Vankomisin dan Madu Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. dr. Enny Suswati, M.Kes, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala kesempatan serta fasilitas yang telah diberikan selama menempuh pendidikan.
2. dr. Enny Suswati, M.Kes, selaku dosen pembimbing utama dan dr. Cicih Komariah, Sp.M, selaku dosen pembimbing anggota, atas segala bimbingan serta arahan selama proses pengerjaan skripsi ini.
3. dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA selaku ketua tim penguji dan dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A, selaku anggota I yang telah memberikan masukan dan menyempatkan diri hadir untuk menguji skripsi ini.
4. Kedua orangtua saya Bapak Zaenudin dan Ibu Trisnani Susilowati yang senantiasa memberikan semangat, dukungan dan doa.
5. Kakak-kakak saya Mohammad Iqbal dan dr. Lukman Hakim, Mbak Lia dan Mbak Baiti, serta keponakan-keponakan saya Fakril, El dan Fakri atas dukungan, doa serta semangat.
6. Randhy Revandho Vega dan keluarga atas semangat, dukungan serta doa.
7. Sahabat-sahabat terbaik saya Risty Pradana Linggan Wangi, Maulina Irianto, Putri Dwi Fitriani, Azmi Falah, dan Okta Eka Suryani yang senantiasa memberikan segala bentuk bantuan, pengorbanan, motivasi, semangat dan doa mulai dari awal penyusunan hingga akhir skripsi ini.
8. Teman-teman Vesalius yang selalu memberikan bantuan.

9. Mbak Nuris dan Mbak Lilis, selaku analis Laboratorium Biomolekul dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta seluruh civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah banyak membantu selama proses penelitian.
10. Semua pihak yang membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis memohon maaf jika pada skripsi ini masih terdapat kesalahan. Terimakasih.

Jember, 19 Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.1 Taksonomi.....	4
2.1.2 Morfologi dan Identifikasi	5
2.1.3 Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan	5
2.1.4 Faktor Virulensi	5
2.2 Vankomisin	6
2.2.1 Farmakodinamik	7
2.2.2 Farmakokinetik	7
2.2.3 Dosis.....	8
2.2.4 Efek Samping.....	8
2.2.5 Resistensi Vankomisin.....	8
2.3 Madu	9
2.3.1 Kandungan Madu.....	9
2.3.2 Jenis-jenis Madu	9
2.3.3 Madu Sebagai Antibakteri	10
2.3.4 Madu Randu.....	11
2.3.5 Kombinasi Madu dan Antibiotik.....	12
2.3.6 Madu Untuk Pengobatan Luka	12
2.4 Kerangka Konseptual Penelitian	14
2.5 Hipotesis Penelitian	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Jenis Penelitian	16
3.2 Rancangan Penelitian	16
3.3 Sampel	18

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.4.1 Tempat Penelitian	18
3.4.2 Waktu Penelitian	18
3.5 Variabel Penelitian	18
3.5.1 Variabel Bebas	18
3.5.2 Variabel Terikat	19
3.5.3 Variabel Terkendali.....	19
3.6 Definisi Operasional	19
3.7 Alat dan Bahan	20
3.8 Prosedur Penelitian	20
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	20
3.8.2 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD).....	20
3.8.3 Persiapan Alat	21
3.8.4 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) dan Pemeliharaan Bakteri	21
3.8.5 Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Broth</i> (MHB).....	21
3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri.....	21
3.8.7 Pembuatan Larutan Madu	22
3.8.8 Pembuatan Stok Solution Vankomisin	22
3.8.9 Uji Kombinasi	22
3.8.10 Pengelolaan Limbah Mikrobiologi	23
3.9 Analisis Data	23
3.10 Alur Penelitian	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Hasil Penelitian	25
4.1.1 Uji Pendahuluan.....	25
4.1.2 Uji Kombinasi	25
4.2 Analisis Data	28
4.3 Pembahasan	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Taksonomi bakteri <i>S. aureus</i>	4
4.1 Hasil penilaian kadar pH.....	25
4.2 Hasil pengukuran <i>optical density</i> (OD) dengan pemberian kombinasi vankomisin dan madu berbagai konsentrasi	26
4.3 Hasil penghitungan peningkatan persentase daya hambat vankomisin dikombinasikan dengan madu berbagai macam konsentrasi dalam %...	28
4.4 Hasil uji normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	29
4.5 Hasil Uji LSD.....	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> perbesaran 32.000x dilihat dengan mikroskop elektron	5
2.2 Kerangka konseptual penelitian	14
3.1 Rancangan penelitian	17
3.2 Alur penelitian.....	24
4.1 Hasil inokulasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan vankomisin 2 µg/mL yang dikombinasikan dengan madu pada <i>microplate</i>	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Skema pembuatan larutan madu	41
3.2 Persetujuan Etik	42
3.3 Gambar Penelitian	45
4.1 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	48
4.2 Hasil Uji Homogenitas	48
4.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	48
4.4 Hasil Uji LSD	49
4.5 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	50
4.6 Hasil Uji Regresi Linier	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram positif yang dapat ditemukan sebagai flora normal pada 30 % mukosa hidung serta kulit manusia (Levinson, 2012). *S. aureus* pertama kali ditemukan oleh seorang ahli bedah Skotlandia bernama Alexander Ogston pada tahun 1880 sebagai salah satu penyebab pus paling sering (Miljkovic-Selimovic *et al.*, 2015). Di Indonesia pada tahun 2012 tercatat 30,19 % dari 53 sampel yang diperoleh dari pus pasien di RSUD dr. Moewardi merupakan bakteri *S.aureus*. Penelitian sebelumnya pada tahun 2007 di RSI Kustati Surakarta juga melaporkan adanya 19 isolat *S.aureus* dari 21 sampel pus yang diperiksa (Chudlori *et al.*, 2012). Di samping itu *S.aureus* juga merupakan bakteri patogen yang mampu menyebabkan infeksi mulai infeksi kulit ringan sampai infeksi sistemik yang dapat mengancam jiwa. Ditemukan bahwa di negara maju dan berkembang prevalensi infeksi akibat *S. aureus* berkisar antara 10 sampai 30 kasus per 100.000 orang tiap tahunnya. Sebuah penelitian di Amerika Serikat mencatat prevalensi infeksi kulit dan jaringan lunak akibat *S.aureus* mengalami peningkatan dari 1,2 juta kasus di tahun 1993 menjadi 3,4 juta kasus di tahun 2005 (Tong *et al.*, 2015).

Vankomisin saat ini menjadi salah satu antimikroba untuk mengatasi infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus*. Namun kepekaan *S. aureus* terhadap vankomisin semakin menurun bahkan menjadi resisten. Pada tahun 2014 di RSUP Mohammad Hoesin Palembang dari 1118 isolat *S.aureus*, 19 isolat atau 1,7 % diantaranya merupakan *Vancomycin resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) dan 1 isolat atau 0,1 % merupakan *Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus* (VISA). Selain itu pada tahun 2010 dari 64 isolat *S. aureus* di Rumah Sakit Margono Soekarjo Purwokerto, 10 isolat atau 15,6% diantaranya merupakan VRSA (Afifurrahman *et al.*, 2014).

Bahan alam seperti madu saat ini menjadi alternatif yang populer sebagai salah satu komponen antimikroba yang banyak digunakan untuk mengatasi resistensi (Liu *et al.*, 2015). Madu mengandung 17% air, 38,2% fruktosa, 0,7%

sukrosa, 0,2% mineral, dan 0,3% asam amino (Bogdanov, 2010). Kandungan madu yang sebagian besar merupakan monosakarida tersebut mempengaruhi osmolaritas madu yang menyebabkan mikroorganisme seperti bakteri tidak dapat hidup. Disamping itu madu juga memiliki komponen-komponen lain yang menjadi salah satu faktor pendukung yaitu kandungan peroksida, nonperoksida seperti fenol dan pH yang asam. Kandungan peroksida pada madu salah satunya hidrogen peroksida mampu meningkatkan stres oksidatif pada bakteri sehingga memicu terjadinya degradasi DNA. Kandungan fenol, flavonoid, dan alkaloid pada madu juga mampu meningkatkan kinerja bakteri dengan memutuskan ikatan peptidoglikan pada bakteri. pH asam madu tidak mendukung bakteri untuk hidup karena bakteri mampu tumbuh dan berkembangbiak pada pH 7 (Hariyati, 2010)(Sahputra, 2014).

Madu digunakan secara topikal untuk mengobati luka bakar, luka infeksi kronik, dan ulkus kaki diabetik (Djoenaedi dan Sudjatmiko, 2012). Madu biasa diaplikasikan secara topikal dan dikombinasikan dengan antibiotik topikal maupun sistemik (Campeau dan Patel, 2013). Madu dikombinasikan dengan antibiotik untuk meningkatkan efek terapi, menurunkan jumlah konsumsi antibiotik dan mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh antibiotik serta mencegah resistensi (Liu *et al.*, 2015). Madu mampu meningkatkan daya antibakteri beberapa antibiotik diantaranya Vankomisin, Piperasilin atau Tazobactam, Penisilin G, Kanamisin, Rifampisin, Tetrasiklin, Imenepem, Ceftrizoxime, Ciprofloxacin, dan Mupirocin (Jenkins dan cooper, 2012). Berdasarkan penelitian terdahulu penambahan madu terhadap vankomisin dapat meningkatkan diameter zona hambat strain *S. aureus*.

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti ingin meneliti efek kombinasi vankomisin dan madu terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah baru tentang efek kombinasi vankomisin dan madu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang di atas, rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan antara kombinasi vankomisin dan madu dengan vankomisin tunggal dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?
2. Berapakah konsentrasi minimum madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara kombinasi vankomisin dan madu dengan vankomisin tunggal dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi minimum madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek kombinasi vankomisin dan madu terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat dan tersusun irreguler seperti buah anggur. Bakteri tersebut dapat hidup dalam berbagai macam media dan aktif secara metabolik, memfermentasi karbohidrat, dan memproduksi pigmen yang bervariasi mulai dari putih hingga kuning pekat. Beberapa jenis bakteri ini merupakan flora normal pada kulit dan membran mukosa, namun disamping itu bakteri jenis ini juga mampu menyebabkan berbagai macam infeksi mulai infeksi kulit sampai septikemia yang dapat berakibat fatal. *Staphylococcus* menyebabkan penyakit dipengaruhi oleh dua hal yaitu kemampuannya untuk menyebar luas dan bermultiplikasi dalam jaringan serta melalui produksi zat ekstraseluler seperti toksin dan enzim (Brooks *et al.*, 2013).

Genus *Staphylococcus* sedikitnya mempunyai 40 spesies. Namun hanya beberapa spesies yang seringkali penting dalam klinis diantaranya *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, dan *Staphylococcus saprophiticus*. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang memiliki sifat koagulase positif yang menjadi pembeda dengan spesies *Staphylococcus* yang lainnya (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.1 Taksonomi

Taksonomi bakteri *S. aureus* dapat dilihat pada tabel 2.1

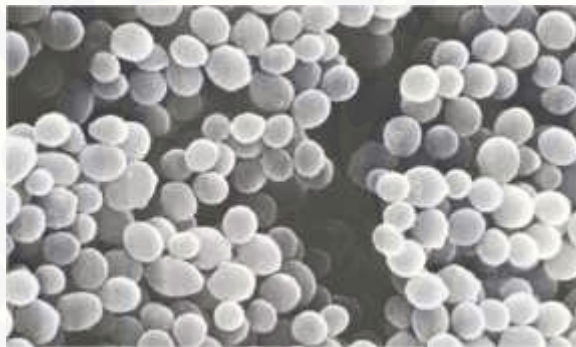
Tabel 2.1 Klasifikasi *S. aureus*

Klasifikasi <i>S.aureus</i>	
Domain	Bacteria
Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Familia	Staphylococcaeae
Genus	<i>Staphylococcus</i>
Spesies	<i>Staphylococcus aureus</i>

(Sumber : Prescott *et al.*, 2002)

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif dengan diameter 0,5-1,5 μm yang memiliki karakter berbentuk bulat (*cocci*) dan berkerumun menyerupai buah anggur (Costa *et al.*, 2013). Bakteri ini termasuk dalam famili *Micrococcaceae* yang memiliki genom kromosom sirkuler sekitar 2800 kb (kilobasa) memiliki plasmid dan transposon (Yuwono, 2010). Bakteri ini bersifat katalase dan koagulase positif, non motil, tidak membentuk spora serta bersifat anaerob fakultatif (Stark, 2013). Gambar *S.aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus* perbesaran 32.000x dilihat dengan mikroskop elektron (Sumber: Brooks *et al.*, 2013)

2.1.3 Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan

S.aureus mudah tumbuh dalam berbagai jenis media dan aktif secara metabolik. *S.aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat. Bakteri ini dapat tumbuh paling cepat pada suhu 37°C namun mampu membentuk koloni paling baik pada temperatur ruang (20-25°C). (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4 Faktor Virulensi

S.aureus mampu menyebabkan infeksi karena kemampuannya bermultiplikasi dan menyebar dengan cepat dalam jaringan juga disebabkan oleh produksi beberapa substansi ekstraselular. Beberapa diantaranya adalah enzim dan toksin (Brooks *et al.*, 2013).

Enzim yang berperan dalam faktor virulensi diantaranya katalase, koagulase, hyaluronidase, nuklease, protease, dan staphylokinase. Enzim katalase berperan sebagai faktor virulensi dengan cara menguraikan hidrogen peroksida. Enzim koagulase berikatan dengan protrombin untuk menjadi enzim aktif yang mampu mengkatalisis fibrinogen menjadi fibrin. Fibrin tersebut kemudian melapisi bakteri yang menyebabkan bakteri memiliki daya tahan terhadap opsonisasi dan fagositosis. Bakteri ini memiliki enzim hyaluronidase yang menyebabkan bakteri mampu menghidrolisis matrix intraseluler yang mempermudah bakteri menyebar pada jaringan berdekatan. Enzim ini juga memudahkan bakteri untuk mendapatkan asupan nutrisi dari jaringan di sekitarnya. Bakteri ini juga memiliki enzim nuklease yang juga berperan dalam memberikan nutrisi yang diambil dari jaringan sekitarnya untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan. Faktor virulensi lain yang menyebabkan bakteri ini mudah menyebar dalam jaringan adalah kemampuan fibrinolisis yang disebabkan oleh enzim protease dan staphylokinase yang dimilikinya (Stark, 2013).

Selain enzim, toksin juga berperan penting terhadap faktor virulensi *S.aureus*. Toksin yang terdapat pada *S.aureus* disebut dengan istilah eksotoksin. Eksotoksin pada *S. aureus* dapat mengakibatkan aktivitas sitolitik. Toksin sitolitik (sitotoksin) ini dapat membentuk pori pada membran plasma. Pori tersebut mengakibatkan terjadinya kebocoran dan akhirnya diikuti oleh lisisnya sel target host (Miljkovic-Selimovic *et al.*, 2015).

Infeksi akibat *S.aureus* tidak hanya disebabkan oleh satu faktor virulensi saja melainkan beberapa faktor yang bekerja bersamaan dalam proses patogenik. Hal ini dibuktikan oleh sebuah studi dengan menggunakan hewan yang dipapar oleh isolat mutan dengan mengurangi satu faktor virulensi dibandingkan dengan kontrol menggunakan isolat biasa. Hasilnya adalah terjadinya penurunan tingkat keparahan infeksi pada kelompok yang menggunakan isolat mutan (Stark, 2013).

2.2 Vankomisin

Vankomisin merupakan antimikroba golongan glikopeptida yaitu molekul berukuran besar yang bekerja menghambat tahap akhir sintesa peptidoglikan dan

anyamannya (*cross linked*). Efek bakterisidal vankomisin lambat sehingga memerlukan pemberian berulang dan memiliki risiko infeksi berulang (*relapse*) sangat tinggi.

2.2.1 Farmakodinamik

Secara umum vankomisin bekerja mencegah reaksi transglikosilasi dan transpeptidasi sehingga terjadi kegagalan sintesa dinding sel. Pada *S.aureus* terdapat dua macam target pengikatan yaitu residu D-alanil-D-alanin pada lapisan peptidoglikan dan monomer murein pada membran sitoplasma yang menjadi substrat untuk reaksi glikosiltransferase. Ikatan glikopeptida pada D-alanil-D-alanin akan mengganggu formasi *cross bridge* yang dimediasi PBP. Sedangkan ikatan pada murein menyebabkan hambatan total sintesa peptidoglikan sehingga sel menjadi ruptur dan mati. Untuk dapat mencapai target murein, molekul glikopeptida harus mampu menembus kurang lebih 20 lapis peptidoglikan. Jika terjebak pada target pertama yaitu D-alanil-D-alanin maka obat tersebut tidak akan efektif (Yuwono, 2010).

2.2.2 Farmakokinetik

Vankomisin diberikan secara intravena, tidak dapat diberikan secara intramuskuler (IM) maupun secara oral karena absorpsi yang buruk pada saluran pencernaan dan akan menimbulkan nyeri bila diberikan IM. Vankomisin tidak mengalami modifikasi pada metabolisme hati dan dikeluarkan melalui ginjal dalam bentuk aktif. Bagi pasien dengan fungsi ginjal normal waktu paruh mencapai 6-8 jam. Vankomisin mencapai konsentrasi yang tinggi serta dapat mencapai level terapi ketika mencapai darah, pleura, perikardial, sinovial dan cairan asites namun tidak mencapai kadar terapi pada cairan serebrospinal dan *vitreous* serta *acqueous humor* pada mata. Aktivitas antibakteri vankomisin bersifat time dependent sehingga harus dipertahankan konsentrasi di atas nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*).

2.2.3 Dosis

Dosis vankomisin untuk pasien dengan fungsi ginjal yang masih normal adalah 15 mg/kgBB selama 12 jam atau 8 mg/kgBB selama 6-8 jam. Pengurangan dosis dapat dilakukan pada pasien dengan fungsi ginjal tidak normal, obesitas, luka bakar, atau kelebihan cairan. Untuk menghindari ototoksisitas dan nefrotoksisitas serta untuk mencapai dosis yang efektif maka konsentrasi dalam serum dan kadar puncak vankomisin harus dipantau setiap saat. Umumnya kadar efektif di serum sekitar 5-10 µg/mL dan kadar puncak sekitar 20-40 µg/mL dicapai 1 jam setelah infus selesai (Yuwono, 2010)

2.2.4 Efek Samping

Efek samping yang paling sering timbul adalah demam, menggigil dan plebitis pada tempat infus akibat lepasnya histamin. Efek tersebut dapat dikurangi dengan memperlambat kecepatan dengan volume cairan lebih besar. Efek ototoksisitas dan nefrotoksisitas saat ini sudah jarang dijumpai. Penggunaan bersamaan dengan aminoglikosida harus dihindari karena dapat meningkatkan efek toksik obat (Yuwono, 2010). Dikarenakan toksisitasnya tergantung dosis yang diberikan maka konsentrasinya di dalam plasma juga harus selalu diawasi (Ritter *et al.*, 2008).

2.2.5 Resistensi vankomisin

Staphylococcus aureus diketahui mengalami penurunan kepekaan terhadap antimikroba golongan glikopeptida khususnya vankomisin sejak ditemukannya strain *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* (VISA) pada tahun 1966 di Jepang. Penemuan tersebut diikuti oleh penemuan- penemuan selanjutnya di berbagai negara. Pada tahun 2010 di Rumah Sakit Margono Soekarjo Purwokerto ditemukan 10 dari 64 isolat dari membran stetoskop atau 15,6 % merupakan *S. aureus* yang resisten terhadap vankomisin (VRSA). Pada bulan Oktober 2011 hingga September 2013 di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang ditemukan 57 isolat VRSA dan 1 isolat VISA dari total 2670 isolat (Afiffurrahman, 2014).

Mekanisme resistensi vankomisin diduga disebabkan oleh penebalan dinding sel dan penurunan sintesis enzim autolitik. Penebalan dinding sel terjadi akibat peningkatan jumlah peptidoglikan. Molekul-molekul vankomisin akan terjebak pada lapisan peptidoglikan sebelum mencapai membran sitoplasma dimana terjadi sintesis peptidoglikan yang menjadi target utama vankomisin yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel (Hiramatsu, 2002).

Lapisan peptidoglikan baru akan selalu terbentuk dipermukaan membran sitoplasma, Lapisan baru ini akan menggantikan lapisan di atasnya sedangkan lapisan terluar akan dieliminasi keluar permukaan sel dengan enzim autolitik. Beberapa strain VRSA dapat menurunkan secara drastis aktivitas enzim autolitik tersebut sehingga lapisan peptidoglikan yang lama gagal di eliminasi (Hiramatsu, 2002).

2.3 Madu

Madu merupakan substansi alam yang diproduksi oleh lebah madu yang dikumpulkan dari nektar bunga, diubah dan disimpan dalam sarang lebah untuk dimatangkan.

2.3.1 Kandungan madu

Madu terdiri dari 17% air, 38,2% fruktosa, 0,7% sukrosa, 0,2% mineral, dan 0,3% asam amino. Madu mengandung beberapa enzim diantaranya glukose oksidase yang mengatur produksi hidrogen peroksida. Selain itu madu juga memiliki kandungan zat antioksidan berupa flavonoid, polifenol, fenol, alkaloid dan volatin (Bogdanov, 2010).

2.3.2 Jenis-jenis Madu

Madu memiliki banyak jenis berdasarkan proses karakteristiknya. Karakteristik madu dapat dibedakan berdasarkan sumber nektarnya, letak geografis serta proses pembuatannya. Madu berdasarkan sumber nektarnya dibedakan menjadi dua yaitu madu monoflora dan madu poliflora. Madu monoflora merupakan madu yang diperoleh dari satu tumbuhan utama. Penamaan madu monoflora juga dibedakan berdasarkan sumber nektanya seperti madu

kelengkeng, madu rambutan, madu kopi dan madu randu. Madu monoflora umumnya merupakan madu ternak karena lebah diternakkan untuk menghasilkan madu jenis ini. Jenis madu lain yaitu madu poliflora merupakan madu yang nektarnya diperoleh dari beberapa jenis tumbuhan. Contoh madu poliflora adalah madu hutan yang diperoleh dari lebah hutan (Hariyati, 2010).

Madu juga dapat dibedakan jenisnya berdasarkan letak geografis asal madu tersebut diproduksi misalnya madu Timur Jauh, madu Yaman dan madu Cina. Berdasarkan prosesnya madu juga dapat dibedakan teknologi perolehannya yaitu diperas langsung dari sarangnya (madu peras) atau melalui proses sentrifugasi (madu ekstraksi) (Hariyati, 2010).

2.3.3 Madu sebagai antibakteri

Potensi antibakteri madu telah banyak dibuktikan pada beberapa studi. Secara garis besar terdapat beberapa faktor yang berperan penting dalam sifat antibakterial madu yaitu osmolaritas, pH madu dan aktifitas senyawa peroksida dan non peroksida. Ketiga komponen ini diduga saling mendukung satu sama lain untuk meningkatkan kemampuan madu sebagai antibakteri (Aggad dan Guemour, 2014).

1. Osmolaritas

Osmolaritas berperan penting dalam daya antibakteri madu. Madu merupakan larutan jenuh atau lewat jenuh dari gula dengan kandungan air hanya kurang lebih 15-21% dari berat total. Komponen lain yang terkandung pada madu sebesar sekitar 84% merupakan campuran dari monosakarida yang terdiri dari glukosa dan fruktosa. Kandungan tersebut mengakibatkan daya osmosis madu menjadi tinggi. Osmolaritas yang tinggi tersebut menyebabkan terjadinya interaksi yang kuat antara molekul-molekul gula dan air yang berakibat kurangnya molekul air bagi mikroorganisme untuk bertahan hidup, sehingga mikroorganisme termasuk bakteri akan kekurangan air dan mengalami dehidrasi sehingga mudah terjadi lisis (Nadhilla, 2014).

2. pH Madu

pH madu tergolong rendah untuk pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme lainnya. Madu hutan, madu randu, madu rambutan, dan madu kelengkeng memiliki pH berturut-turut sebesar 3,78; 3,56; 3,81; dan 4,09. Keasaman yang tinggi akan meningkatkan konsentrasi ion hidrogen sehingga gradien transmembran proton bakteri terganggu. Akibatnya sel akan membawa proton melalui pompa proton yang mengakibatkan kehabisan energi. Secara garis besar kadar pH yang asam akan menyebabkan terganggunya ikatan ion yang berakibat pada terganggunya transport nutrisi (Hariyati, 2010).

3. Senyawa peroksida dan non peroksida

Senyawa peroksida yang terkandung dalam madu yaitu hidrogen peroksida dan senyawa non peroksida yaitu fenol berperan penting dalam aktivitas antibakteri madu. Hidrogen peroksida pada madu berperan meningkatkan stres oksidatif pada bakteri, hal ini dapat mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat akibat degradasi DNA bakteri (Brudzynski *et al.*, 2011). Berdasarkan studi yang telah dilakukan oleh Brudzynski *et al.* terbukti bahwa madu dengan konsentrasi H_2O_2 yang rendah tidak mampu memecah DNA namun dengan penambahan H_2O_2 madu mampu mengembalikan sifat antibakterinya dengan mendegradasi DNA bakteri.

Senyawa fenol sebagai senyawa non peroksida juga berperan penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Bakteri memiliki ikatan peptidoglikan yang memberikan kekuatan pada bakteri. Senyawa fenol mampu memutuskan ikatan peptidoglikan tersebut saat menembus dinding sel serta merusak struktur membran sel sehingga terjadi kebocoran isi dan menyebabkan pertumbuhan dan metabolisme sel terganggu (Hariyati, 2010). Terdapat senyawa non peroksida lainnya yang juga berpengaruh terhadap integritas dinding sel yaitu flavonoid dan alkaloid (Sahputra, 2014).

2.3.4 Madu Randu

Madu randu merupakan jenis madu monoflora yang diperoleh dari nektar pohon randu (Hariyati, 2010). Madu randu berwarna coklat muda dan bening serta

memiliki rasa manis sedikit asam (Pratiwi, 2014). Madu randu memiliki kadar pH 3,56 lebih rendah jika dibandingkan dengan madu kelengkeng dan madu rambutan (Hariyati, 2010). Madu randu juga memiliki aktivitas antibakteri lebih baik daripada madu kopi dengan diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypii* 0,592 cm dan 0,747 cm.

2.3.5 Kombinasi madu dan antibiotik

Madu yang telah banyak diteliti dan dikombinasikan dengan antibiotik adalah madu manuka dari New Zealand. Madu manuka dapat meningkatkan daya hambat rifampisin, tetrasiklin, imenepem, dan mupirocin terhadap bakteri MRSA dan *Pseudomonas aureginosa* secara *in vitro* menggunakan metode *broth dilution* dan didapatkan MIC terhadap kedua bakteri adalah 6 % (w/v) (Jenkins dan Cooper, 2012). Madu sidr dan sommor dari Saudi Arabia juga mampu meningkatkan efektifitas ofloksasin, piperasilin, amoksisilin dan asam klavulanat, serta trimethoprim+sulphamethoxazole terhadap bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes* dengan MIC 80 % (v/v) (Masoud *et al.*, 2015).

2.3.6 Madu Untuk Pengobatan Luka

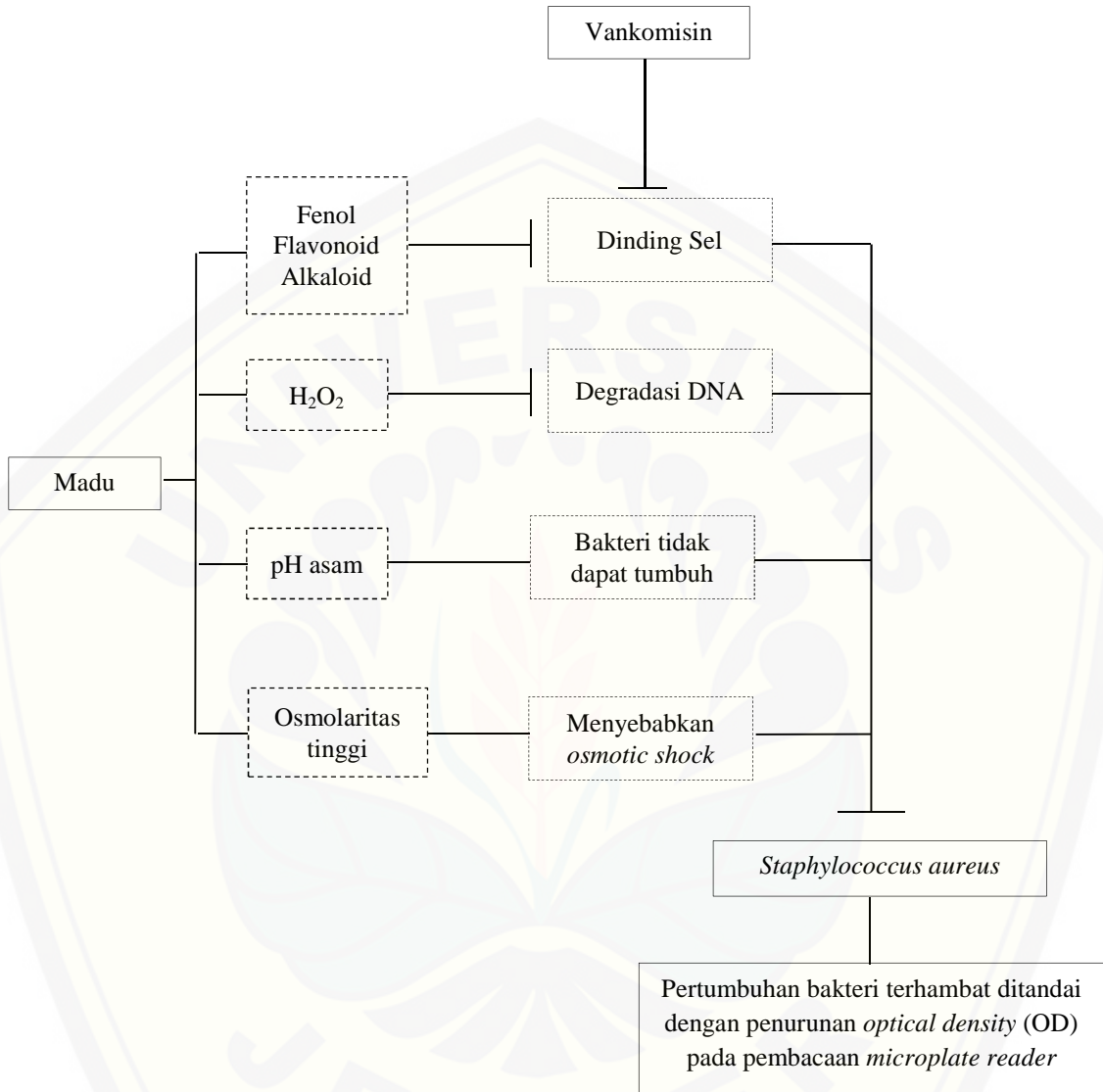
Madu sudah banyak diaplikasikan dalam pengobatan medis profesional untuk menyembuhkan luka bakar, ulkus kaki diabetik, dan luka kronik infeksi . Telah terbukti bahwa madu mampu menyembuhkan luka besar yang gagal disembuhkan baik dengan menggunakan pengobatan topikal maupun sistemik. Madu juga dapat menyembuhkan luka *post operative* pada neonatus yang tidak mempunyai respon terhadap terapi antibiotik. Pada tahun 2012 sebuah penelitian meneliti seorang pasien dengan sepsis dan luka nekrotik berulkus pada genitalia dan resisten dengan antibiotik kemudian dilakukan sebuah *treatment* pengobatan topikal dengan madu yang belum diproses. Hasil menunjukkan terjadi penyembuhan luka dalam 1 bulan dilakukan *treatment* (Djoenaedi dan Sudjatmiko, 2012) .

Madu yang banyak digunakan untuk perawatan luka akibat infeksi adalah madu manuka dari New Zealand. Berdasarkan penelitian di RSCM tahun 2010

Madu lokal (Madu Murni Nusantara) juga efektif mengatasi infeksi *P.aureginosa*, MRSA, dan *S.aureus*. Meskipun demikian konsentrasi minimum (MIC) madu lokal untuk mencapai efek inhibisi lebih tinggi dibandingkan madu manuka (Gunawan, 2017).



2.4 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

- : Diteliti
- : Tidak diteliti
- : Menghambat

Gambar 2.2 Kerangka konseptual Penelitian

Vankomisin mencegah sintesis dinding sel bakteri dengan cara berikatan dengan residu D-alanil-D-alanin pada lapisan peptidoglikan dan monomer murein pada membran sitoplasma (Hiramatsu, 2002). Madu memiliki kandungan senyawa antibakteri yaitu fenol, flavonoid dan alkaloid yang bekerja dengan cara memutuskan rantai peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran isi sel, terjadi kegagalan metabolisme dan pertumbuhan serta kegagalan sintesis dinding sel (Hariyati, 2010). Madu juga memiliki kandungan peroksida yang mampu menyebabkan degradasi DNA (Brudzynski *et al.*, 2011). Selain itu madu memiliki osmolaritas yang tinggi sehingga menyebabkan bakteri mengalami dehidrasi dan pada akhirnya terjadi plasmolisis. pH madu cenderung asam (pH 3-5) yang tidak mendukung lingkungan bakteri untuk tumbuh dan berkembangbiak (Djoenadi dan Sudjatmiko, 2012).

Dalam penelitian ini kombinasi vankomisin dan kemampuan antibakteri madu diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan adanya penurunan *optical density* (OD) pada pembacaan *microplate reader*.

2.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan antara kombinasi vankomisin dan madu dengan vankomisin tunggal dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

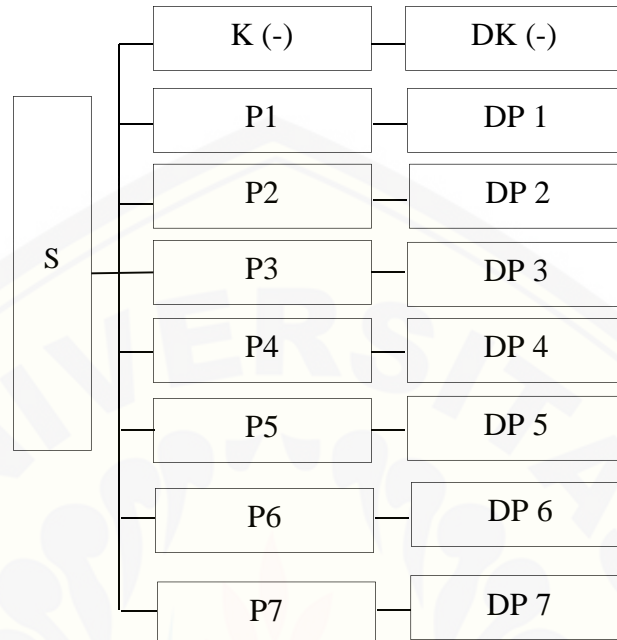
3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *quasy experimental* atau penelitian eksperimental semu karena pada penelitian ini tidak dilakukan randomisasi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris karena efek yang terjadi merupakan hasil dari variabel bebas oleh peneliti dan penelitian dilakukan di laboratorium (Praktiknya, 2008)

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *postest only control group design* dimana hanya dilakukan pengukuran akhir tanpa pengukuran awal (Praktiknya, 2008).

Dalam rancangan penelitian ini sampel dibagi menjadi 8 kelompok. Kelompok perlakuan sebanyak 7 sampel berupa bakteri dan madu dengan berbagai konsentrasi yang dikombinasikan dengan vankomisin dan kelompok kontrol negatif sebanyak satu sampel berupa bakteri dan vankomisin. Rancangan penelitian disajikan pada gambar 3.1.



Keterangan :

S: Bakteri *S. aureus*

K (-): Kelompok kontrol negatif dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL

P 1: Kelompok perlakuan 1 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 1,25%

P 2: Kelompok perlakuan 2 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 2,5%

P 3: Kelompok perlakuan 3 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 5%

P 4: Kelompok perlakuan 4 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 10%

P 5: Kelompok Perlakuan 5 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 20%

P 6: Kelompok perlakuan 6 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 40%

P 7: Kelompok perlakuan 7 dengan *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 80%

DK (-) : Data Kontrol negatif *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL

DP (1) :Data kelompok perlakuan 1 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 1,25%

DP (2) : Data kelompok perlakuan 2 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 2,5%

DP (3) : Data kelompok perlakuan 3 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 5%

DP (4) : Data kelompok perlakuan 4 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 10%

DP (5) : Data kelompok perlakuan 5 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 20%

DP (6) : Data kelompok perlakuan 6 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 40%

DP (7) : Data kelompok perlakuan 7 *S. aureus*+ vankomisin 2 µg/mL + madu 80%

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

3.3 Sampel

Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali sesuai dengan rumus

Federer :

$$(t-1)(r-1) = 15$$

$$(8-1)(r-1) = 15$$

$$7(r-1) = 15$$

$$7r = 22$$

$$r = 4$$

Keterangan

t = jumlah kelompok

r = jumlah pengulangan

Berdasarkan rumus diatas maka penelitian dilakukan dengan jumlah penelitian 8 kelompok yang terdiri dari 7 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan pengulangan sebanyak 4 kali pada setiap perlakuan.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Pembiakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan perlakuan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sedangkan pengukuran *optical density* dilaksanakan di Laboratorium Biomolekul Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2017.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi dari madu yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 80%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai *optical density* pada pembacaan *microplate reader*.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini terdiri dari pembuatan biakan bakteri, media *Mueler Hinton Broth (MHB)*, inkubator, suhu dan waktu inkubasi, akuades steril, dan metode pengukuran daya hambat.

3.6 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S.aureus* didapatkan dan dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

2. Vankomisin

Antibiotik yang digunakan adalah vankomisin sediaan vial 500 mg dengan merek dagang Vancep®.

3. Madu

Madu yang digunakan yaitu madu kemasan yaitu Madu Randu dari peternak madu di kecamatan Silo. Konsentrasi madu yang digunakan yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 80% diperoleh dari penelitian sebelumnya yang didapatkan peningkatan zona hambat antibiotik yang dikombinasikan dengan madu pada konsentrasi 1,25 mL/mL, 2,5 mL/mL, 5 mL/mL (Fitriani, 2016), 10 %, 20 %, 40 % dan 80 % (Masoud *et al.*, 2015).

4. Kombinasi madu dan vankomisin

Kombinasi madu dan vankomisin merupakan kombinasi antara vankomisin dengan konsentrasi 2 µg/mL dan madu dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, dan 80% yang dilakukan dengan metode mikrodilusi dan dihitung menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 630 nm.

5. Konsentrasi Minimum

Konsentrasi terkecil dari madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dihitung dengan

menggunakan alat *microplate reader*. Untuk mengetahui persentase peningkatan daya hambat digunakan rumus sebagai berikut(Liu *et al.*, 2015) :

$$\text{daya hambat (mL/mL)} = \frac{(\text{OD kontrol negatif} - \text{OD sampel})}{\text{OD kontrol negatif}} \times 100 \text{mL/mL}$$

3.7 Alat dan Bahan

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari *handscoon*, *biosavety cabinet*, sterilisator, inkubator, autoklaf, *microplate u-bottom polystyrene 96 wells*, tabung reaksi, ose, mikropipet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, media MHB, vankomisin sediaan vial 500 mg, madu dan akuades steril.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik. Persetujuan etik pada penelitian ini berada pada Lampiran 3.2.

3.8.2 Penggunaan Alat Pelindung Diri (APD)

Untuk memastikan keamanan peneliti karena kontak dengan agen infeksius maka diperlukan alat pelindung diri yang terdiri dari jas lab, sarung tangan dan masker (Perwitasari dan Anwar, 2006). Serta semua tindakan yang kontak dengan bakteri dilakukan pada *biosafety cabinet* yang tersedia di laboratorium FK UNEJ. *Biosafety cabinet* di laboratorium mikrobiologi FK UNEJ menggunakan prinsip radiasi sinar ultraviolet. Untuk menggunakan alat ini terlebih dahulu dihidupkan dan didiamkan selama 30 menit agar kontaminasi yang dapat mempengaruhi penelitian dapat dieliminasi.

3.8.3 Persiapan Alat

Seluruh peralatan yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Semua alat yang telah dicuci ditutup dengan kapas atau aluminium foil. Setelah itu peralatan dimasukkan ke dalam sterilisator dengan

suhu 121°C selama 15 menit. Setelah 15 menit dilakukan sterilisasi alat diambil dengan hanscoon agar tidak terkontaminasi oleh lingkungan.

3.8.4 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) dan Pemeliharaan Bakteri

Serbuk dalam kemasan media ditimbang sesuai dengan kebutuhan dan dilarutkan dalam aquades dan dilakukan proses pembuatan sesuai dengan prosedur dalam kemasan. Kemudian media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dan didinginkan sampai suhu 60°C. Selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri (CLSI, 2014).

Bakteri induk *Staphylococcus aureus* diambil dengan menggunakan ose kemudian digoreskan pada media NA. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bakteri kemudian disimpan pada suhu 4°C dan digunakan sebagai stok bakteri (Mahon *et al.*, 2015).

3.8.5 Pembuatan Media *Mueler Hinton Broth* (MHB)

Media yang digunakan yaitu media MHB. Media MHB yang digunakan yaitu media kemasan dengan bentuk serbuk, selanjutnya media disiapkan sesuai dengan petunjuk yang ada pada kemasan. Media yang telah dididihkan dituangkan ke dalam wadah dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media tersebut disimpan pada suhu 2-8°C.

3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi *Staphylococcus aureus* dibuat dengan cara mengambil satu ose kuman kemudian dimasukkan dan dihomogenkan kedalam 4 ml MHB Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi kemudian disesuaikan dengan kekeruhan standar konsentrasi 0.5 Mc Farland (10^8 CFU/mL). Penyesuaian suspensi bakteri dengan standar dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhannya dengan kertas berlatar putih dan memiliki garis hitam (CLSI, 2014).

3.8.7 Pembuatan Larutan Madu

Pembuatan larutan madu diawali dengan pembuatan madu dengan konsentrasi 80%. Madu dengan konsentrasi 80% didapatkan dengan cara melarutkan madu 8 mL dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL kemudian dilakukan pencampuran komponen dengan *vortex*. Untuk mendapatkan konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% dilakukan dilusi bertingkat sebagaimana terlampir pada lampiran 3.2 (Fitriani, 2016).

3.8.8 Pembuatan stok solution vankomisin

Dalam pembuatan stok solution vankomisin diperlukan pelarut berupa akuades. MIC vankomisin adalah 2 $\mu\text{g/mL}$ (IDSA, 2009) maka pada penelitian akan dilakukan pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi vankomisin 2 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan dengan mencampur vankomisin serbuk vial sebanyak 32 mg dengan akuades steril sebanyak 2 mL sehingga konsentrasi larutan menjadi 16 mg/mL. Selanjutnya dari konsentrasi 16 mg/mL diambil 1 mL dan ditambahkan 1 mL sehingga konsentrasi menjadi 8 mg/mL. Hal yang sama dilakukan sampai mencapai konsentrasi 2 mg/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga konsentrasi menjadi 0,002 mg/mL atau setara dengan 2 $\mu\text{g/mL}$.

3.8.9 Uji Kombinasi

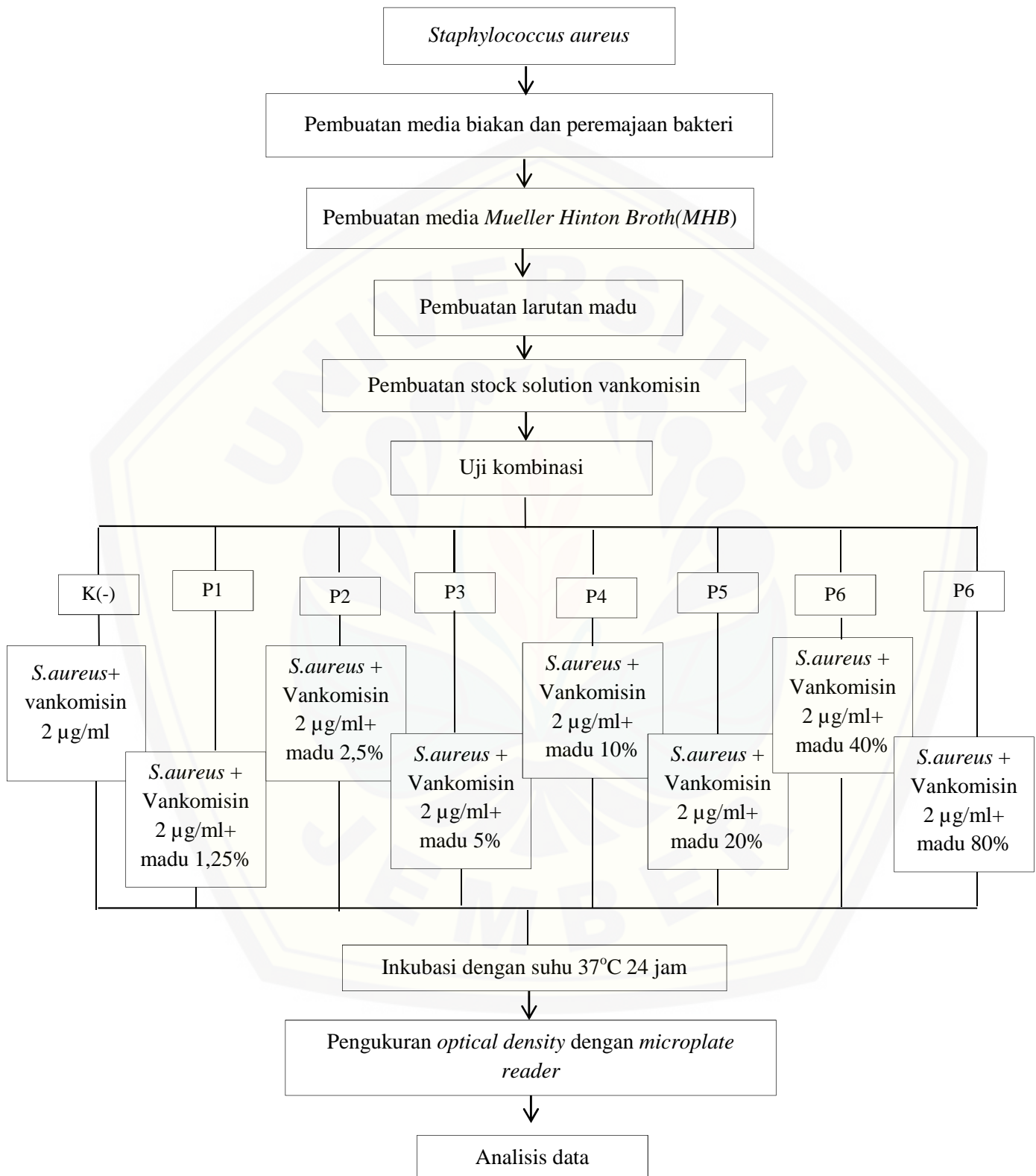
Pada kelompok kontrol diberikan vankomisin 2 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 75 μL dan MHB sebanyak 75 μL . Pada kelompok perlakuan diberikan media MHB yang telah tersuspensi dengan bakteri sebanyak 50 $\mu\text{l/well}$ dan vankomisin 2 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 50 $\mu\text{l/well}$. Kemudian ditambahkan dengan madu dengan konsentrasi yang berbeda pada setiap perlakuan sebanyak masing-masing *well* 50 $\mu\text{l/well}$. Setelah itu *plates* dipipetting secara hati-hati untuk mencampurkan isi pada masing-masing *well*. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37°C pada inkubator selama 24 jam. Setelah itu dihitung dengan menggunakan *microplate reader* (Liu *et al.*, 2015).

3.8.10 Pengelolaan Limbah Mikrobiologi

Limbah cair yang tidak terkontaminasi kuman dikumpulkan dan dibuang di saluran air. Sementara itu, limbah padat dikirim ke RSUD Dr. Soebandi untuk dihancurkan. Sisa sampel dan media yang terkontaminasi kuman diautoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit supaya kuman mati. Semua alat yang digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disimpan kembali.

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh nantinya akan berupa data kuantitatif yaitu nilai *optical density* (OD). Untuk dilakukan uji parametrik perlu diketahui distribusi data. Karena sampel 50 maka dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Data dikatakan terdistribusi normal apabila nilai $p > 0,05$. Kemudian analisa data dilanjutkan dengan *Levene's test* untuk menentukan homogenitas. Data dikatakan homogen apabila $p > 0,05$. Apabila persebaran data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA*. Untuk mengetahui variabel yang memiliki perbedaan signifikan maka dilakukan post hoc test yaitu dengan uji *Least Significance Different* (LSD). Data yang diperoleh kemudian diuji korelasi *Pearson*. Hasil persentase kemudian dianalisis dengan menggunakan regresi linear untuk mendapatkan nilai kadar minimum madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap pertumbuhan *S.aureus*.

3.10 Alur penelitian

Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Terdapat perbedaan antara kombinasi vankomisin dan madu dengan vankomisin tunggal dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
2. Konsentrasi minimum madu yang dapat meningkatkan daya hambat vankomisin terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 4,511 % (v/v)

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, peneliti memberi saran :

1. Perlu adanya kontrol yaitu bakteri tanpa perlakuan apapun (*untreated control*) dan kontrol berupa madu tanpa kombinasi.
2. Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan kontrol ketat terhadap faktor yang mampu mempengaruhi kualitas madu meliputi suhu serta kontaminasi terhadap madu.
3. Untuk penelitian selanjutnya perlu digunakan madu yang telah terstandart dan tersertifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifurrahman., K. H. Samadin, dan S. Aziz. 2014. Pola Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik *Vancomycin* di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. *MKS*. 46(4): 266-270
- Bogdanov, S. 2010. Honey in Medicine. *Bee Product Science*. 2(1): 1-23
- Brooks, G. F., C. Carrol, J. S. Butel, S. A. Morse, dan T. A. Mietzer. 2013. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Adelberg. Edisi 26. Mc Graw Hill LANGE.
- Brudzynski, K., K. Abubaker, L. St-Marine, dan A. Castle. 2011. Re-examining The Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology*. 2(213): 1-9
- Campeau, M. E. M., dan R. Patel. 2014. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. *International Journal of Bacteriolog Hindawi Publishing Corporation*.
- Chudlori, B., M. Kuswandi, P. Indrayudha. 2012. Pola Kuman dan Resistensinya terhadap Antibiotika dari Spsimen Pus di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2012. *PHARMACON*. 13(2): 70-76
- CLSI (Clinical and Laboratory Standart Institute). 2014. Perfomance standart for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational suppelement. 34(1).
- Costa, A. R., D. W. F. Bastitao, R. M. Ribas, A. M. Sousa, M. O. Pereira, dan C. M. Botelho. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. *FORMATEX*. 702-710.
- Cushnie, T. P. T. Dan A. J. Lamb. 2005. Review Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Elvesier*. 343-356
- Dahlan, M. S. 2104. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Deresinski, S.2009. Vancomycin in Combination with Other Antibiotics for Treatment of Serious Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Infection Disease Society of America*. 49(7): 1072-1079
- Djoenadi, I., dan G. Sudjatmiko.2012. Topical Honey Aplication In Treating Large Ulcerated Wound as a Complication of Vascular Malformation In a 5-Mounth-Old Baby. *JPRJournal*. 1(2): 182-186

- Dzoyem, J. P., H. Hamamoto, B. Ngameni, B. T. Ngadjui, dan K. Sekimizu. 2013. Antimicrobial action mechanism of flavonoid from *Dorstenia* species. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 7(2): 66-72
- Fitriani, P. D. 2016. Efek Kombinasi Kloramfenikol dan Madu Terhadap Pertumbuhan *Salmonella Typhii* secara *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember
- Gunawan, N.A.2017.Madu: Efektivitasnya Untuk Perawatan Luka. CDK-249 *Continuing Professional Development*. 44(2): 138-142
- Hariyati, L. F. 2010. Aktivitas Antibakteri Berbagai Jenis Madu Terhadap Mikroba Pembusuk. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret
- Hiramatsu, K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistant. *THE LANCET*. 1: 147
- Howden, B. P., J. K. Davies, P. D. R. Johnson, T. P. Stinear, dan M. L. Grayson. 2010. Reduced Vankomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanism, Laboratory Detection and Clinical Implications. *Clinical Microbiology*. 23(1): 99-139
- H. Aggad., dan D. Guemour. 2014. Honey Antibacterial Activity. *Medicinal & Aromatic Plants*. 3(2): 100015
- Jenkins, R., dan R. Cooper. 2012. Improving Antibiotic Activity against Wound Pathogens with Manuka Honey *In Vitro*. *PLOS ONE*. 7(9): 1-9
- Liu, M., J. Lu, P. Muller, L. Tumbull, C. M. Burke, R. C. Schlothauer, D. A. Carter, C. B. Whitchurch, dan E. J. Harry. 2015. Antibiotic-specific Differences in Response of *Staphylococcus aureus* to Treatment with Antibiotic Combined with Manuka Honey. *Frontiers in Microbiology*. 5(779). 1-9
- Mahon, C. R., D. C. Lehman, dan G. Manuselis. 2015. *Textbook of Diagnostic Microbiology Fifth Edition*. W. B Saunders Company
- Masoud, E., A. Alqurashi, dan M. Alamin. 2015. Synergistic Effect of Honey and Commonly Used Antibiotics on Gram Positive Bacteria. *Wulfenia Journal*. 22(10).
- Milkjkovic-Selimovic, B., M. Dinic, J. Orlovic, dan T. Babic. 2015. *Staphylococcus aureus*: Immunopathogenesis and Human Immunity. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 32.(4): 243-257

- Muller, P., D. G. Albar, L. Turnbull, R. C. Schlothauer, D. A. Carter, C. B. Whitchruch, E. J. Harry. 2013. Synergism between Medihoney and Rifampicin against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLOS ONE*. 8(2): 1-9
- Nadhilla, N. F. 2014. The Activity of Antibacterial Agent of Honey Against *Staphylococcus aureus*. *J Majority*. 3(7): 94-101
- Perwitasari, D., dan A. Anwar. 2006. Tingkat Risiko Pemakaian Alat Pelindung Diri dan Higiene Petugas di Laboratorium Klinik RSUPN Ciptomangunkusumo, Jakarta. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 5(1): 380-384
- Praktiknya, A. W. 2008. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi 1. Jakarta: Raja Grafindo Persada
- Pratiwi, R. H. 2014 Potensi Kapuk Randu (*Ceiba petandra gaertn*) dalam Penyediaan Obat Herbal. *E-Journal WIDYA Kesehatan dan Lingkungan*. 1(1)
- Prescott, L. M., J. P. Harley dan D. A. Klein 2002. *Microbiology*. Sted. New York. Mc Graw Hill.
- Ritter, J. M., L. D. Lewis, T. G. Mant, dan A. Ferro. 2008. *A textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. UK. Hodder Arnold.
- Sahputra, A. 2014. Uji Efektivitas Madu Karet dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Sherwood, L. 2011. *Fisiologi Manusia: Dari Sel ke Sistem*. Edisi 6. EGC.
- Stark, L. 2013. *Staphylococcus aureus- Aspects of Pathogenesis and Molecular Epidemiology*. *Disertasi*. Sweden. *Faculty of Health Sciences Linkoping University*
- Stevens, D. L., A. L. Bisno, H. F. Chamber, E. P. Delinger, E. J. C. Goldstein, S.L. Gorbach, J. V. Hirschmann, S. L. Kaplan, J. G. Montoya, dan J. C. Wade. 2014. Practice Guidline for the Diagnosis and Management of Skin and Soft Tissue Infections: 2014 Update by the Infetious Diseases Society of America. *USA Guidline*. 59(2):e10–52
- Tong, S. Y.C., J. S. Davis, E. Eichenbeger, T. L. Holland, dan V.G. Fowler. 2015. *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*. *CMR Journal*. 28(3): 603-661

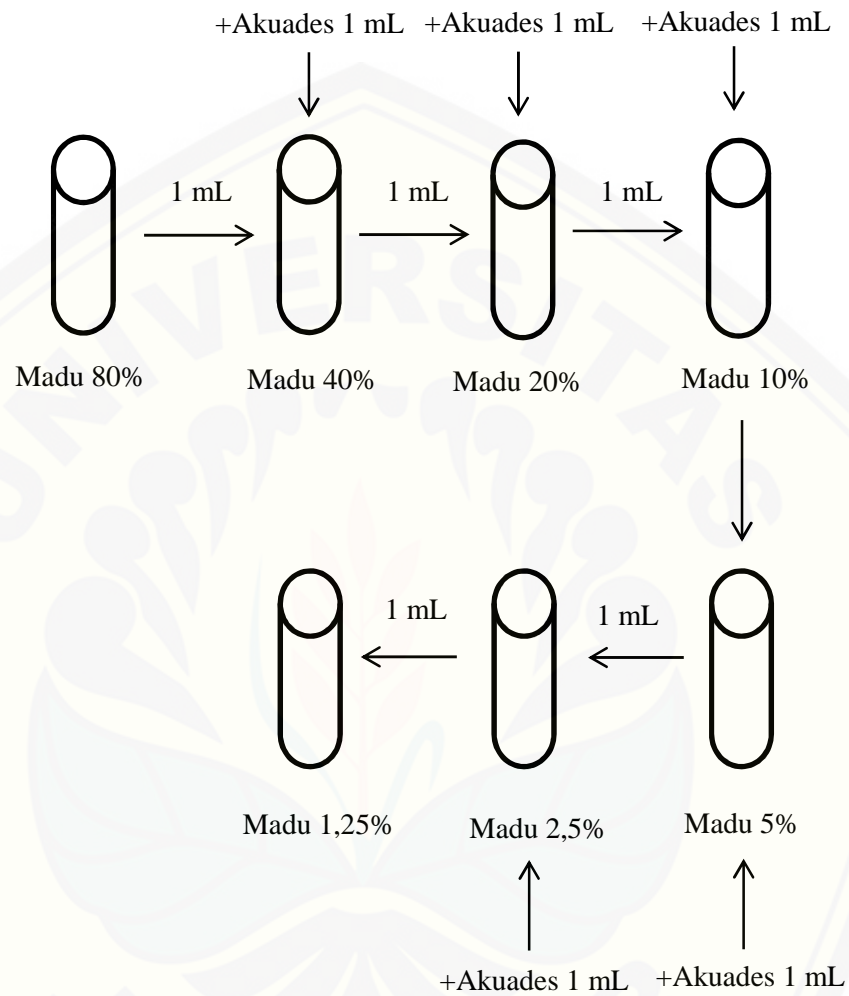
Universitas Jember. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: Badan Penerbit Universitas Jember.

Yuwono. 2010. *Mekanisme Molekuler Resistensi Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Palembang: Departemen Mikrobiologi Universitas Sriwijaya.



LAMPIRAN

3.1 Skema pembuatan larutan madu



3.2 Persetujuan Etik



The image shows a document titled 'KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK' (Ethical Approval Certificate) from Universitas Jember. The document is on a light-colored background with a large, faint watermark of the university's logo in the center. At the top left is the official seal of Universitas Jember. The text is in Indonesian and English. It states that the Ethics Committee of the Faculty of Medicine has reviewed a proposal for a study on the effect of a combination of vancomycin and honey on the growth of Staphylococcus aureus in vitro. The proposal is approved. The principal investigator is Aisyah Pratiwi Maharani (NIM.132010101016) from the Faculty of Medicine, Universitas Jember. The approval is dated June 15, 2017, and is signed by dr. Rini Riyanti, Sp.PK, the Chair of the Ethics Committee.

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : 1.145/H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEK KOMBINASI VANKOMISIN DAN MADU TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO

Nama Peneliti Utama : Aisyah Pratiwi Maharani (NIM.132010101016)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 15 Juni 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian

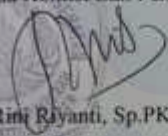
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik


(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

- Mohon dijelaskan cara pembuangan limbah di laboratorium mikrobiologi terutama limbah dari penggunaan mikroorganisme.
- Mohon dijelaskan bagaimana aturan keamanan (*safety rule*) saat penelitian. Misalnya: penggunaan *biosafety cabinet*
- Perhatikan *biohazard* laboratorium mikrobiologi mengingat MRSA adalah bakteri yang patogen dan merupakan *biohazard* level III, maka demi keamanan dan keselamatan peneliti dan orang sekitarnya sebaiknya hindari penggunaan MRSA karena laboratorium mikrobiologi FK UNEJ belum memenuhi *biohazard* untuk MRSA.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian


dr. Rini Rayanti, Sp.PK

Jember, 18 APRIL 2017
Reviewer


dr. Dini Agustina, M.Biomed

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

- Miten dipelihara kontrol kualitas standar Mikrobiologi.
- Miten dipelihara pemantauan limbah mikrobiologi agar tidak mencemari lingkungan.

Jember, 15 Juni 2017
Reviewer

Nama: dr. Rini Riyanti, Sp.PK

3.3 Gambar Penelitian



Madu Randu



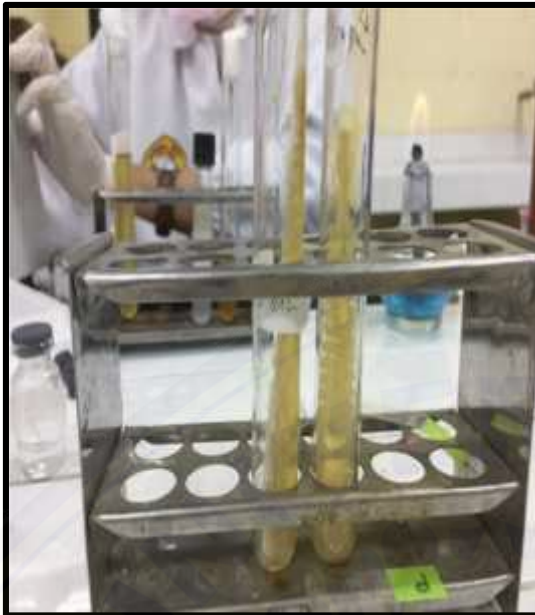
Vankomisin sediaan vial



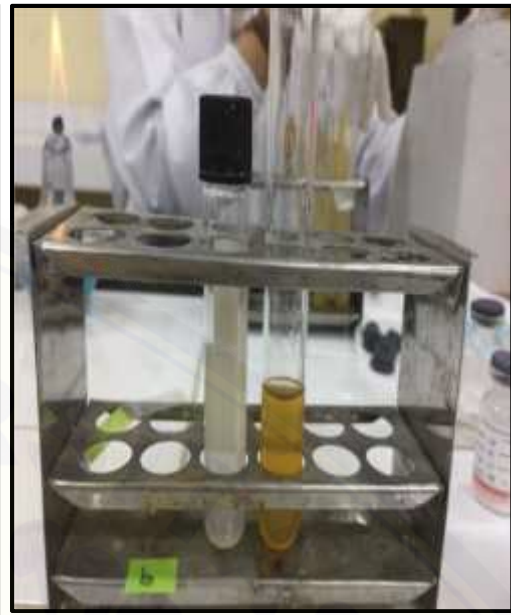
Hasil pengenceran madu berbagai macam konsentrasi



Hasil pengenceran untuk stok vankomisin



Stok Bakteri *Staphylococcus aureus*



Standar Mc Farland dan MHB yang telah disuspensi dengan bakteri



Media MHB



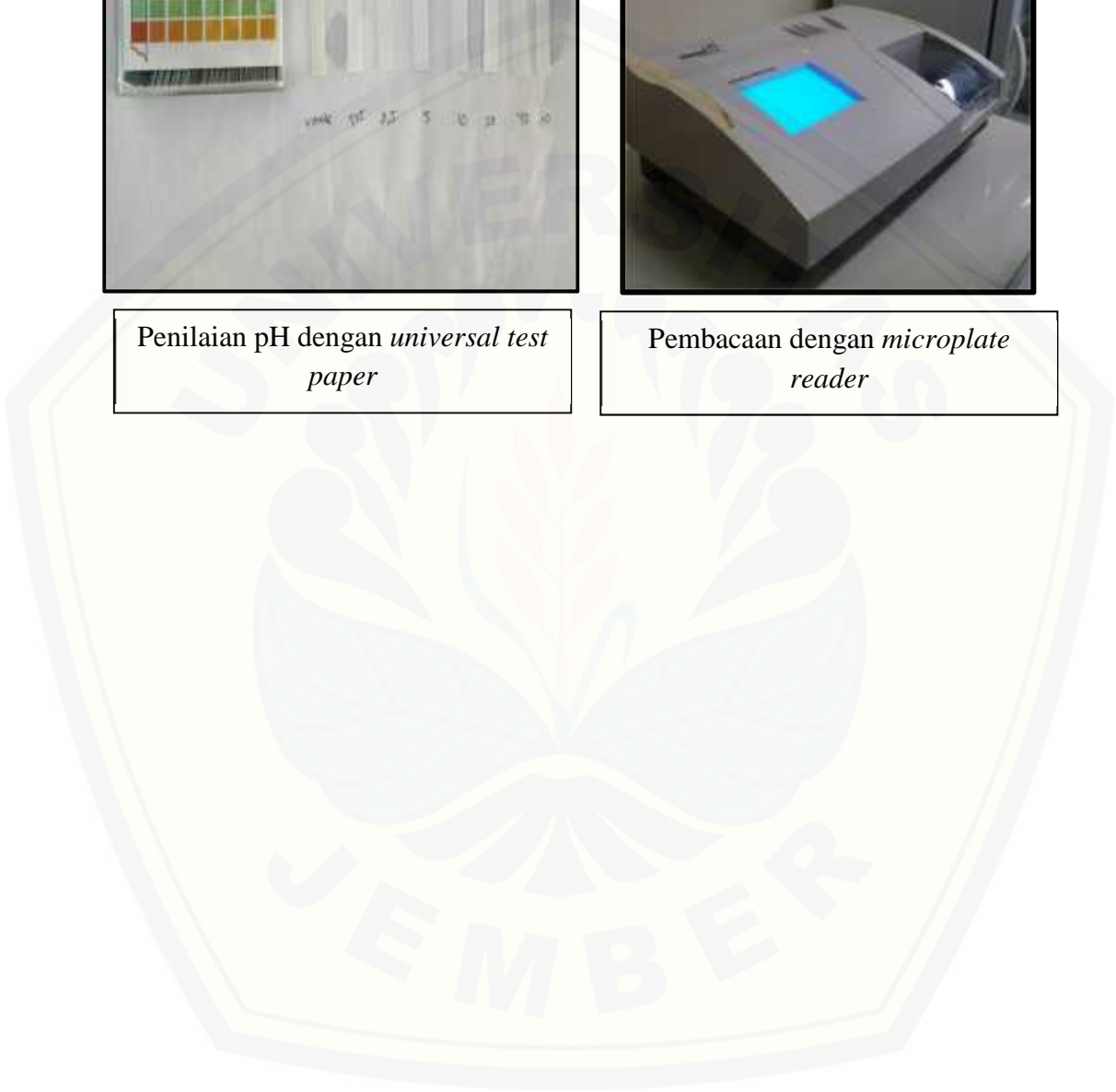
Microplate yang telah diisi bakteri, vankomisin dan madu



Penilaian pH dengan *universal test paper*



Pembacaan dengan *microplate reader*



4.1 Hasil Uji Normalitas

Tests of Normality

	presentase	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD	K-	,378	4	.	,810	4	,122
	P1	,268	4	.	,903	4	,447
	P2	,227	4	.	,966	4	,816
	P3	,272	4	.	,864	4	,275
	P4	,302	4	.	,829	4	,166
	P5	,200	4	.	,957	4	,761
	P6	,293	4	.	,834	4	,178
	P7	,377	4	.	,813	4	,127

a. Lilliefors Significance Correction

4.2 Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

OD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,685	7	24	,683

4.3 Hasil Uji *One Way Anova***ANOVA**

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,232	7	,747	404,103	,000
Within Groups	,044	24	,002		
Total	5,277	31			

4.4 Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

LSD

(I) Konsen trasi	(J) Konsen trasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	P1	,09000*	,03041	,007	,0272	,1528
	P2	,13450*	,03041	,000	,0717	,1973
	P3	,20575*	,03041	,000	,1430	,2685
	P4	,26500*	,03041	,000	,2022	,3278
	P5	,38375*	,03041	,000	,3210	,4465
	P6	,49300*	,03041	,000	,4302	,5558
	P7	1,36200*	,03041	,000	1,2992	1,4248
P1	K-	-,09000*	,03041	,007	-,1528	-,0272
	P2	,04450	,03041	,156	-,0183	,1073
	P3	,11575*	,03041	,001	,0530	,1785
	P4	,17500*	,03041	,000	,1122	,2378
	P5	,29375*	,03041	,000	,2310	,3565
	P6	,40300*	,03041	,000	,3402	,4658
	P7	1,27200*	,03041	,000	1,2092	1,3348
P2	K-	-,13450*	,03041	,000	-,1973	-,0717
	P1	-,04450	,03041	,156	-,1073	,0183
	P3	,07125*	,03041	,028	,0085	,1340
	P4	,13050*	,03041	,000	,0677	,1933
	P5	,24925*	,03041	,000	,1865	,3120
	P6	,35850*	,03041	,000	,2957	,4213
	P7	1,22750*	,03041	,000	1,1647	1,2903
P3	K-	-,20575*	,03041	,000	-,2685	-,1430
	P1	-,11575*	,03041	,001	-,1785	-,0530
	P2	-,07125*	,03041	,028	-,1340	-,0085
	P4	,05925	,03041	,063	-,0035	,1220
	P5	,17800*	,03041	,000	,1152	,2408
	P6	,28725*	,03041	,000	,2245	,3500
	P7	1,15625*	,03041	,000	1,0935	1,2190
P4	K-	-,26500*	,03041	,000	-,3278	-,2022
	P1	-,17500*	,03041	,000	-,2378	-,1122

	P2	-,13050*	,03041	,000	-,1933	-,0677
	P3	-,05925	,03041	,063	-,1220	,0035
	P5	,11875*	,03041	,001	,0560	,1815
	P6	,22800*	,03041	,000	,1652	,2908
	P7	1,09700*	,03041	,000	1,0342	1,1598
	K-	-,38375*	,03041	,000	-,4465	-,3210
	P1	-,29375*	,03041	,000	-,3565	-,2310
P5	P2	-,24925*	,03041	,000	-,3120	-,1865
	P3	-,17800*	,03041	,000	-,2408	-,1152
	P4	-,11875*	,03041	,001	-,1815	-,0560
	P6	,10925*	,03041	,001	,0465	,1720
	P7	,97825*	,03041	,000	,9155	1,0410
	K-	-,49300*	,03041	,000	-,5558	-,4302
	P1	-,40300*	,03041	,000	-,4658	-,3402
P6	P2	-,35850*	,03041	,000	-,4213	-,2957
	P3	-,28725*	,03041	,000	-,3500	-,2245
	P4	-,22800*	,03041	,000	-,2908	-,1652
	P5	-,10925*	,03041	,001	-,1720	-,0465
	P7	,86900*	,03041	,000	,8062	,9318
	K-	-1,36200*	,03041	,000	-1,4248	-1,2992
	P1	-1,27200*	,03041	,000	-1,3348	-1,2092
P7	P2	-1,22750*	,03041	,000	-1,2903	-1,1647
	P3	-1,15625*	,03041	,000	-1,2190	-1,0935
	P4	-1,09700*	,03041	,000	-1,1598	-1,0342
	P5	-,97825*	,03041	,000	-1,0410	-,9155
	P6	-,86900*	,03041	,000	-,9318	-,8062

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.5 Hasil Uji Korelasi Pearson

Correlations

		konsentrasi	OD
konsentrasi	Pearson Correlation	1	-,976**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	32	32
OD	Pearson Correlation	-,976**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	32	32

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

4.6 Hasil Uji Regresi Linear

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,976 ^a	,954	,952	5,83250

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	4,093	1,298		3,153	,004
	Konsentrasi	,986	,040	,976	24,815	,000

a. Dependent Variable: Persentase

$$Y = a + bX$$

$$Y = 4,093 + 0,986X$$

Nilai x didapatkan dari perhitungan sebagai berikut :

$$0 = 4,093 + 0,986X$$

$$- 4,093 = 0,986X$$

$$X = 4,511 (\%)$$