

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2025. Sampel diambil dari empat lokasi limbah pemukiman yang berbeda di kabupaten Sidoarjo. Isolasi dan uji resistensi dilakukan di Laboratorium Universitas Muhammadiyah Sidoarjo (UMSIDA).

3.2 Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan beberapa alat dan bahan yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat dan Bahan Penelitian

ALAT	BAHAN
<i>Cool box</i>	Antibiotik tetrasiklin
<i>Hand Glove</i>	Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Cotton bud</i> steril	<i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)
Cawan Petri	<i>Buffered Peptone Water</i>
Inkubator	Kapas
Tabung Reaksi	Aquades
Timbangan digital	
<i>Autoclave Sterilizer</i>	
<i>Laminar Flow</i>	
Ose	
Api Bunsen	
<i>Beaker Glass</i>	

3.3 Metode

3.3.1 Pengkayaan Isolat *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* diisolasi dari limbah pemukiman, sampel yang digunakan adalah 4 sampel limbah pemukiman yang diambil dari 4 lokasi yang berbeda di kabupaten Sidoarjo. Sampel di bawa menggunakan *cool box*

ke laboratorium. Pada hari pertama dilakukan persiapan media *Buffered Peptone Water* dan *Muller Hinton Agar* (MHA). Sebelum membuat media seluruh alat yang akan digunakan dalam penelitian terlebih dahulu di steril menggunakan *Autoclave Sterilizer*. Selanjutnya pembuatan media *Buffered Peptone Water* dengan melarutkan 0,162 gram *Buffered Peptone Water* dan 24 ml aquadest, setelah semuanya tercampur dibagi menjadi 4 cawan dan di sterilisasi dengan suhu 121⁰ C selama 20 menit. Media yang kedua adalah *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan 8,16 gram *Muller Hinton Agar* (MHA) dan 240 ml aquadest di atas api bunsen, setelah larut kemudian media dituang ke dalam 12 cawan petri yang sudah di sterilisasi masing-masing sebanyak 20 ml dan di sterilisasi dengan 121⁰ C selama 20 menit.

Pada hari kedua dilakukan penanaman bakteri *Staphylococcus aureus* pada media *Buffered Peptone Water* yang sudah siap dan diinkubasi dengan suhu 37⁰ C selama 24 jam. Selanjutnya penanaman bakteri kembali pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) untuk melakukan pengujian resistensi dengan sediaan antibiotik tetrasiklin dan diinkubasi dengan suhu 37⁰ C selama 18 hingga 24 jam.

3.3.2 Uji Kirby-Bauer

Uji sensitivitas terhadap antibiotik bertujuan untuk menilai seberapa efektif antibiotik dapat menghambat atau membunuh bakteri, salah satu metode yang umum dipakai untuk pengujian ini adalah uji Kirby-Bauer yang merupakan metode standar untuk menentukan seberapa sensitif bakteri terhadap antibiotik (Badria *et al.*,2023). Menurut Saputri (2019) uji Kirby

Bauer adalah salah satu teknik difusi yang telah banyak diterapkan di laboratorium sejak tahun 1996. Prinsip dari pengujian sensitivitas antibiotik dengan menggunakan metode Kirby Bauer didasarkan pada penghambatan pertumbuhan mikroba oleh antibiotik pada media agar yang telah diinokulasi.

Dalam metode difusi paper disk (Kirby-Bauer), disk kertas yang telah diresapi dengan antibiotik diletakkan pada agar yang telah diinokulasi dengan bakteri, selanjutnya diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu, sesuai dengan kondisi optimal mikroba yang diuji yakni pada suhu 37⁰ C selama 18 hingga 24 jam dan zona hambat yang terbentuk di sekitar disk diukur untuk menilai sensitivitas bakteri terhadap antibiotik tersebut (Badria *et al.*, 2023).

3.3.3 Interpretasi Hasil

Sampel yang memperlihatkan adanya zona yang terbentuk akan diukur dan akan dibandingkan dengan kunci identifikasi menurut *Clinical and Laboratory Standars Institute*(CLSI, 2017) yang terdiri dari kategori sensitif, intermediet dan resisten terhadap antibiotik tetrasiklin.

Tabel 2. Klasifikasi zona hambat pasca uji Kirby-Bauer

Jenis Antibiotik	Sensitif (S)	Intermediet (I)	Resisten (R)
Tetrasiklin	≥ 15 mm	12-14 mm	≤ 11 mm

Sumber : (CLSI, 2017).

3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dilaporkan dalam bentuk diameter zona hambat. Hasil zona hambat dihitung rerata dan standar deviasinya dan dilaporkan dalam tabel. Hasil dari pengukuran akan dijelaskan secara deskriptif dengan menunjukkan zona yang terbentuk dan akan disajikan juga secara kualitatif dalam bentuk gambar.