

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam studi ini adalah *Pre-Experimental Design*. Desain penelitian ini dianggap belum cukup kuat untuk membuktikan hubungan sebab-akibat antara variabel independen dan variabel dependen. Hal ini disebabkan oleh adanya variabel luar yang dapat memengaruhi variabel dependen tersebut. Oleh karena itu, hasil eksperimen yang menunjukkan variabel dependen tidak dapat dipastikan hanya dipengaruhi oleh variabel independen (Hardani dkk., 2020).

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *one-group pretest-posttest*. Desain *one-group pretest-posttest* melibatkan satu kelompok subjek yang menjalani tes awal (*pretest*) sebelum diberikan perlakuan, dan kemudian melakukan tes akhir (*posttest*) setelah perlakuan diberikan. Dengan demikian, desain ini memungkinkan peneliti untuk membandingkan hasil perlakuan dengan situasi sebelum perlakuan, sehingga efektivitas perlakuan dapat dinilai lebih akurat. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan

dampak waktu penyimpanan media PCA terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium* (Sugiyono, 2013).

Dilakukan penelitian untuk mencari pengaruh perlakuan penyimpanan media *Plate Count Agar* yang segera digunakan dan yang disimpan selama 24 jam pada suhu 2 – 8°C terhadap Angka Lempeng Total bakteri *Salmonella typhimurium*.

Desain penelitian ditunjukkan pada Tabel 1.

Table 1 Desain *One-group pretest-post test*

Sumber : Sugiyono, 2017.

O1 X O2

Keterangan:

O1 : Nilai *pretest* pada media *Plate Count Agar* plate segera digunakan

O2 : Nilai *post test* pada media *Plate Count Agar* plate disimpan selama 24 jam pada suhu 2-8°C.

Pengulangan pada penelitian ini dapat ditentukan dengan rumus Federer sebagai berikut: (Syahdrajat, 2015)

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

Keterangan:

t : treatment (jumlah perlakuan)

r : replication (jumlah pengulangan tiap kelompok)

15 : derajat kebebasan umum

Berdasarkan rumus Federer, maka pada penelitian ini dapat dihitung banyaknya pengulangan sampel dengan minimal yang dapat dilakukan yaitu sebagai berikut:

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

$$(2-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 16$$

Jumlah pengulangan yang akan dilakukan pada penelitian dihitung menggunakan rumus Federer dan diperoleh hasil seperti diatas yaitu pengulangan sebanyak 16 kali.

B. Subjek dan Objek Penelitian

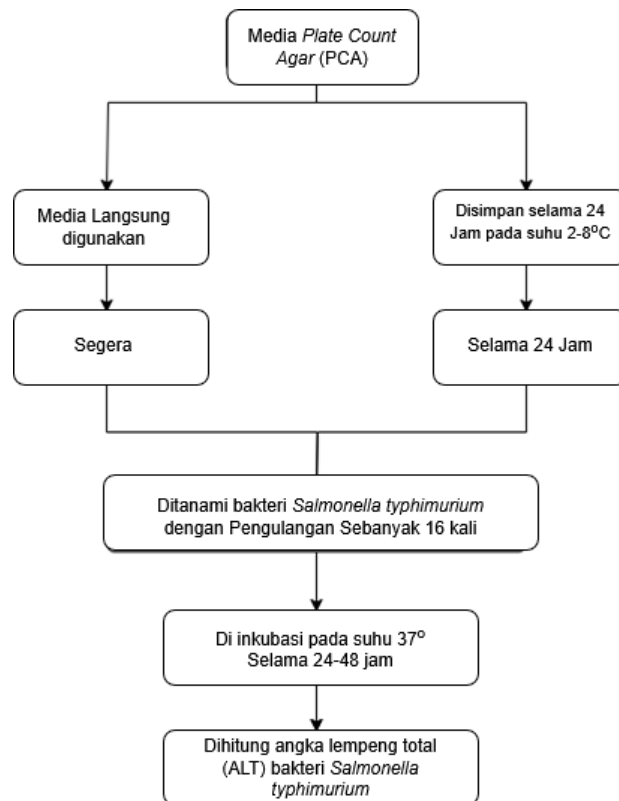
1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhimurium* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta dengan kriteria telah diremajakan dan sudah melalui uji indentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

2. Objek Penelitian

Objek dari penelitian ini adalah Angka Lempeng Total pada media *Plate Count Agar* yang segera digunakan dan disimpan selama 24 jam pada suhu 2-8°C. Kriteria media *Plate Count Agar* yang digunakan yaitu memiliki kondisi dan kualitas yang baik.

C. Alur Penelitian



Gambar. 1 Alur Penelitian

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari- Maret 2025.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah media *Plate Count Agar* (PCA) yang segera digunakan dan disimpan pada suhu 2-8°C selama 24 jam.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah Angka Lempeng Total (ALT) bakteri *Salmonella typhimurium*.

F. Definisi Operasional

1. Hasil pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella typhimurium* merupakan hasil perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) yang tumbuh pada media *Plate Count Agar* (PCA) segera digunakan dan yang disimpan pada suhu 2-8°C selama 24 jam sehingga diperoleh hasil perhitungan dalam satuan *CFU/ml* dengan skala data rasio.
2. Lama simpan media *Plate Count Agar* (PCA) adalah variasi waktu yang digunakan untuk menyimpan media *Plate Count Agar* (PCA) pada suhu 2-8°C di dalam lemari es yang disimpan selama 24 jam.

3. Menyiapkan suspensi bakteri berdasarkan standar *Mc Farlan* 0,5 atau setaradengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml kemudian dilakukan pengenceran bertingkat untuk mengendalikan kepadatan koloni bakteri.
4. Suhu dan kelembapan lemari es adalah temperatur dan kelembapan yang digunakan untuk penyimpanan media *Plate Count Agar* (PCA). Pengendalian dilakukan dengan mengatur dan mengecek suhu agar tetap stabil pada suhu 2-8°C.
5. Waktu inkubasi adalah lama waktu yang dibutuhkan bakteri untuk tumbuh pada media agar. Pengendalian dilakukan dengan melakukan pengamatan 24 – 48 jam setelah penanaman bakteri *Salmonella typhimurium*

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer, yaitu data yang dikumpulkan dan diperoleh secara langsung oleh peneliti dari objek penelitian. Data didapatkan dari perhitungan angka lempeng total bakteri *Salmonella typhimurium* yang tumbuh pada media *Plate Count Agar* (PCA) yang segera digunakan dan disimpan suhu 2-8°C selama 24 jam dengan masing-masing data berjumlah 16 pada setiap kelompok dan seluruhnya berjumlah 32 data.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini:

Bunsen

Rak Tabung Reaksi

Incubator

Korek Api	GelasUkur	<i>Neraca Analitik</i>
Kapas	Gelas Kimia	Tali Rafia
Plastik	<i>Erlenmeyer</i>	Disposable Plate
Kertas Timbang	Batang Pengaduk	Strip pH
Kertas HVS	Oven	
Spidol	Autoclave	
Ose Bulat	Mikropipet	
Ose Jarum	<i>Blue tip</i>	
Tabung Reaksi	<i>Colony Counter</i>	

2. Bahan Penelitian

Bahan Penelitian yang digunakan, yaitu:

- a. Media *Plate Count Agar* (PCA) komposisi utama casein enzymichydrolysisate yang menyediakan asam amino, nitrogen kompleks, dan *yeast extract* yang mensuplai vitamin B kompleks (Angraeni, 2021).
- b. Suspensi bakteri *Salmonella typhimurium*
- c. Akuadest
- d. NaCl 0,85% steril
- e. Standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5

I. Uji Validitas dan Reabilitas

Uji validitas merupakan indikator atau alat ukur yang digunakan untuk menghasilkan data tersebut valid atau sesuai dengan seharusnya, sedangkan uji reabilitas merupakan indikator untuk mengetahui apakah alat ukur yang digunakan beberapa kali untuk mengukur objek yang sama, akan menghasilkan hasil data yang sama (Sugiyono, 2017).

Uji validitas pada penelitian ini berupa sterilitas media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri yang digunakan tidak terjadi kontaminasi, media berada dalam kondisi steril dengan menginkubasi media yang sebelum ditanami bakteri *Salmonella typhimurium* pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam.

Uji reabilitas pada penelitian ini dilakukan dengan cara pengulangan tiap kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Pengulangan dilakukan sebanyak 16 kali pada tiap kelompok dan dihasilkan data sebanyak 32 kali.

J. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut.

1. Tahap Perizinan

a. Perizinan

Peneliti mengajukan perizinan untuk menggunakan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

b. Kaji etik

Peneliti mengajukan persetujuan etik kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Kaji etik diperlukan supaya

dapat melakukan penelitian di lingkungan Politeknik Kesehatan Kemenkes Yogyakarta.

c. Sterilisasi alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian harus dalam keadaan steril, alatharus disterilisasikan terlebih dahulu dengan cara dicuci dengan air atau akuades, dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas bersih dandimasukkan ke dalam oven dengan suhu 110°C selama 8 jam.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.

b. Pembuatan Standar *McFarland* 0,5

- 1) Pembuatan larutan BaCl_2 1%: Ditimbang BaCl_2 sebanyak 1 gram, larutkan dalam labu ukur 100 ml dengan aquadest sampai dengan tandabatas. Homogenkan.
- 2) Pembuatan larutan H_2SO_4 1%: Dipipet H_2SO_4 pekat sebanyak 1,02 ml, masukkan dalam labu ukur 100 ml dengan aquadest sampai dengan tanda batas.
- 3) Pembuatan Larutan *McFarland*: Dipipet larutan BaCl_2 sebanyak 0,05 ml ke dalam labu Erlenmeyer. Dipipet juga larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 ml ke dalam labu erlenmeyer yang sama. Homogenkan dan tutup labu Erlenmeyer menggunakan kapas.
- 4) Diukur absorbansi Standar *McFarland* 0,5 pada panjang gelombang 625 nm memberikan hasil nilai Absorban 0,08 – 0,1.

- 5) Kepadatan bakteri pada standar *McFarland* 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Yanti, 2020).

c. Pembuatan NaCl 0,85%

- 1) Ditimbang natrium klorida sebanyak 0,85 gram dan masukkan kedalam labu Erlenmeyer.
- 2) Dilarutkan aquades ke dalam labu Erlenmeyer hingga mencapai volume 100 ml. Homogenkan. Atur pH hingga menjadi 7,0.
- 3) Disterilkan larutan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit (Utami dkk., 2020).

d. Peremajaan Bakteri *Salmonella typhimurium*

- 1) Bakteri dari biakan murni diambil dengan jarum ose dan ditanamkan ke dalam media miring NA dalam tabung reaksi secara aseptis.
- 2) Penanaman dilakukan secara *zig zag* untuk mendapatkan koloni bakteri yang terpisah.
- 3) Tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam (Yanti, 2020).

e. Pembuatan media *Plate Count Agar* (PCA)

- 1) Ditimbang PCA sebanyak 17,5 gr dan masukkan kedalam erlenmeyer, dilarutkan dengan akuades sebanyak 1000 ml menggunakan gelas ukur kemudian dihomogenkan.
- 2) Media *Plate Count Agar* (PCA) pada erlenmeyer disterilkan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C .

- 3) Masing-masing kultur bakteri dipipet sebanyak 1 ml dari suspensi pengenceran $10^{-1} - 10^{-8}$, dimasukkan ke dalam disposable plate steril.
- 4) Kemudian dituangkan media *Plate Count Agar* cair ke dalam disposable plate steril dan dihomogenkan dengan cara digoyangkan pelan, lalu biarkan hingga media memadat.
- 5) Media diinkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37°C .
- 6) Media disimpan di suhu kulkas selama 24 jam.
- 7) Jumlah perhitungan bakteri dari setiap pengenceran pada rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Jumlah koloni bakteri} \times 1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

- 8) Rata-rata Angka Lempeng Total (ALT)

$$\frac{(a) + (b)}{c}$$

a = Jumlah Koloni Pengulangan ke-1.

b = Jumlah Koloni Pengulangan ke-2.

c = Jumlah Pengulangan Satuan = *CFU*ml.

f. Pembuatan Suspensi bakteri *Salmonella typhimurium*

- 1) Diambil koloni bakteri hasil peremajaan diambil menggunakan ose steril dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,85% sebanyak 1000 μl . Suspensikan biakan murni bakteri hingga kekeruhan larutan sama dengan kekeruhan standar *McFarland* 0,5 (kepadatan bakteri $1,5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$).

- 2) Dilakukan pengenceran 10x dengan memipet suspensi biakan murni bakteri yang telah distandarkan dengan *McFarland* 0,5 sebanyak 1000 μl kedalam tabung 1 yang berisi 9000 μl air garam isotonis (kepadatan bakteri = $1,5 \times 10^{-7} \text{CFU/ml}$).
- 3) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 1 ditambahkan dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 2 (kepadatan bakteri = $1,5 \times 10^{-6} \text{CFU/ml}$).
- 4) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 2 ditambah dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 3 (suspensi bakteri = $1,5 \times 10^{-5} \text{CFU/ml}$).
- 5) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 3 ditambah dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 4 (suspensi bakteri = $1,5 \times 10^{-4} \text{CFU/ml}$).
- 6) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 4 ditambah dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 5 (suspensi bakteri = $1,5 \times 10^{-3} \text{CFU/ml}$).
- 7) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 5 ditambah dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 6 (suspensi bakteri = $1,5 \times 10^{-2} \text{CFU/ml}$).
- 8) Dilakukan pengenceran kembali, sebanyak 1000 μl suspensi bakteri dari tabung 6 ditambah dengan NaCl fisiologis steril sebanyak 9000 μl pada tabung 7 (suspensi bakteri = $1,5 \times 10^{-1} \text{CFU/ml}$).

g. Pengamatan Morfologi

- 1) Bakteri yang telah disuspensi, kemudian ditanam pada media yang segera digunakan dan media *Plate Count Agar* (PCA) yang disimpan selama 24 jam.
- 2) Media yang segera dan yang disimpan pada suhu kulkas diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C.
- 3) Setelah diinkubasi dihitung jumlah Angka Lempeng Total.

K. Manajemen Data

Untuk mengetahui jumlah Angka Lempeng Total (ALT) pada media *Plate Count Agar* (PCA) yang segera diperiksa dan yang disimpan pada suhu 2-8°C selama 24 jam bakteri *Salmonella typhimurium* dilakukan analisis menggunakan analisis deskriptif dan statistika.

1. Penyajian Data

Pengolahan data dilakukan setelah data keseluruhan terkumpul. Data yang diperoleh berupa data primer yang didapatkan langsung dari penelitian yang dilakukan. Data Angka Lempeng Total (ALT) disajikan dalam bentuk tabel dalam satuan *CFU/ml* dan gambar dokumentasi.

2. Analisa Deskriptif

Keseluruhan data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan jumlah Angka Lempeng Total (ALT) *Salmonella typhimurium* yang tumbuh pada media segera digunakan dan yang disimpan pada suhu 2-8°C selama 24-48 jam.

3. Analisa Statistik

Analisis statistik yang dilakukan pada penelitian ini dengan uji statistic menggunakan program SPSS 16.0 for windows. Uji statistik yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan uji *Paired Sample T Test* atau uji Wilcoxon (2 Related Samples). Jika data berdistribusi normal maka menggunakan uji *Paired Sample T Test*, sedangkan jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji Wilcoxon. Sehingga perlu dilakukan uji distribusi data terlebih dahulu untuk menentukan uji yang akan digunakan.

a. Uji Distribusi Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dimasukkan dalam program SPSS 16.0 dan dilakukan uji distribusi data menggunakan *Shapiro Wilk* karena jumlah data yang digunakan ≤ 50 . Dilakukan uji distribusi data untuk mengetahui data tersebut berdistribusi normal atau tidak berdistribusi normal. Data berdistribusi normal (H_0 diterima) jika nilai *Sig* pada *Shapiro Wilk* $\geq 0,05$ dan data tidak berdistribusi normal (H_0 ditolak) jika nilai *Sig* pada *Shapiro Wilk* $< 0,05$.

H_0 : Data berdistribusi normal

H_a : Data tidak berdistribusi normal.

b. Uji *Paired Sample T Test*

Hasil data penelitian yang telah diketahui berdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji beda yaitu uji *Paired Sample T Test* tujuannya untuk mengetahui ada perbedaan atau tidak ada perbedaan rerata

hasil pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Nilai H_0 diterima jika $sig. \geq 0,05$ dan H_0 ditolak jika $sig. < 0,05$.

c. Uji *Wilcoxon* (2 Related Samples)

Uji non parametrik yaitu uji *Wilcoxon* dilakukan apabila data hasil penelitian diketahui tidak berdistribusi normal pada salah satu data atau keduanya. Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada perbedaan atau tidak ada perbedaan rerata hasil pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Nilai H_0 diterima jika $sig. \geq 0,05$ dan H_0 ditolak jika $sig. < 0,05$.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh Surat Kelayakan Etik dengan nomor: No.DP.04.03/e-KEPK.1/308/2025 dari pihak Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta yang berlaku kurun waktu tanggal 25 Februari 2025 sampai dengan Februari 2026.