

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *pre-experiment design* karena masih terdapat variabel luar yang ikut berpengaruh terhadap terbentuknya variabel terikat (Sugiyono, 2013).

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *Post-Test Only Control Group*, dengan desain dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain Penelitian

Perlakuan	Hasil Perlakuan
X1	O1
X2	O2

Sumber: Sugiyono, 2013.

Keterangan:

X1 = Pengamatan mikroskopis sediaan bakteri Gram positif dan Gram negatif menggunakan minyak bunga matahari.

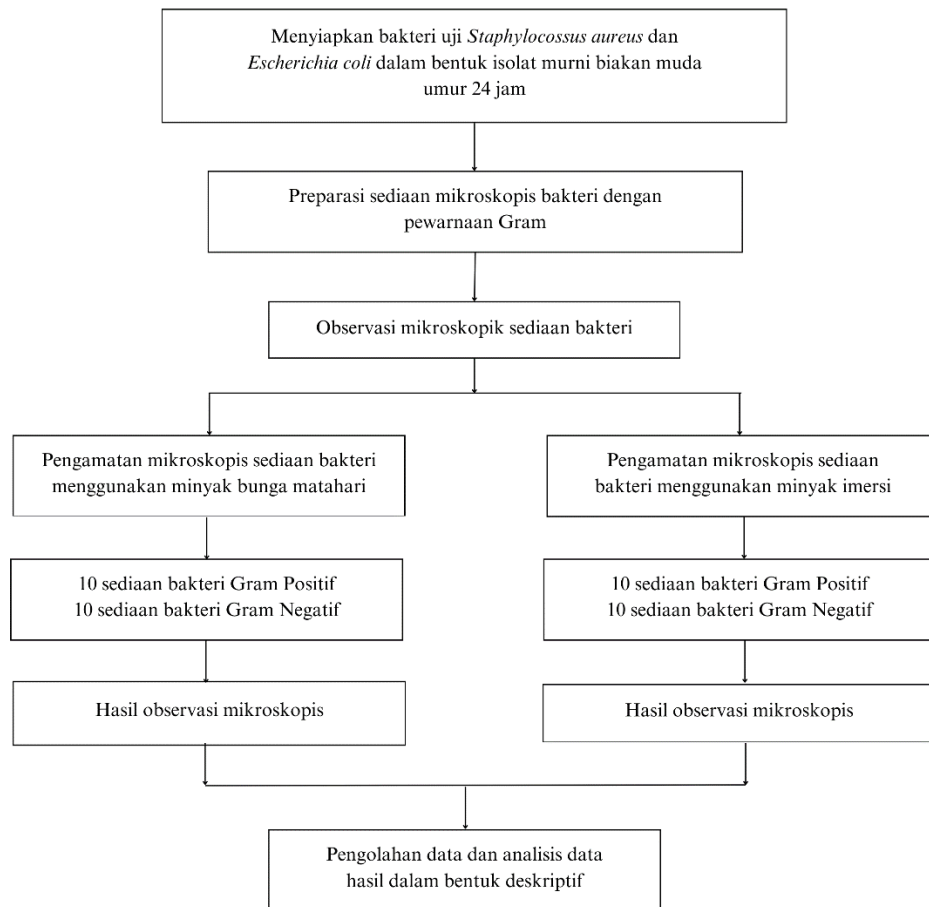
X2 = Pengamatan mikroskopis sediaan bakteri Gram positif dan Gram negatif menggunakan minyak imers.

- O₁ = Penilaian hasil pengamatan mikroskopis sediaan bakteri dengan kriteria ketajaman, kontras dan kecerahan menggunakan minyak bunga matahari
- O₂ = Penilaian hasil pengamatan mikroskopis sediaan bakteri dengan kriteria ketajaman, kontras dan kecerahan menggunakan minyak imersi

Desain penelitian ini yaitu penggunaan minyak untuk pengamatan mikroskopis sediaan bakteri Gram negatif dan Gram positif pada mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x. Kelompok ini kemudian dibagi dua, yaitu satu kelompok untuk eksperimen (yang diberi perlakuan berupa minyak bunga matahari) dan satu kelompok untuk kelompok kontrol (yang diberi berupa minyak imersi) (Sugiyono, 2013).

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Alur penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah preparat sediaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi (BLKK).

2. Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah minyak bunga matahari yang digunakan sebagai media optik untuk pengamatan sediaan mikroskopis bakteri.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Mei 2025.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pengamatan mikroskopis sediaan bakteri dengan minyak bunga matahari dan minyak imersi.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pengamatan penilaian mikroskopis sediaan bakteri yang meliputi ketajaman, kontras dan kecerahan dengan menggunakan minyak bunga matahari dan minyak imersi.

F. Definisi Operasional Variabel

1. Pengamatan mikroskopis sediaan bakteri adalah proses yang dilakukan untuk melihat dan menganalisis preparat bakteri dengan mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x dengan menggunakan minyak bunga matahari sebagai minyak imersi.
2. Hasil pengamatan mikroskopis sediaan bakteri adalah data atau informasi yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis, yang dapat mencakup gambar, deskripsi morfologi bakteri, serta penilaian kualitas hasil pengamatan yang meliputi kecerahan, ketajaman dan kontras.
3. Menurut ISO 8039:1995, kecerahan dalam mikroskop adalah seberapa terang objek yang kita lihat melalui mikroskop. Tingkat terang ini tergantung pada seberapa baik sistem optik mikroskop bekerja (seperti lensa, medium optik dan cahayanya) dan bagaimana pencahayaan diatur.
4. Menurut Slayter & Slayter (1992), ketajaman gambar dalam mikroskop bergantung pada seberapa baik lensa mikroskop dan seberapa tepat fokusnya. Gambar yang tajam berarti gambar tersebut memiliki batas yang jelas dan detail kecil bisa dilihat dengan jelas, tidak terlihat buram atau kabur. Jadi, agar gambar terlihat jelas, kita perlu memastikan lensa yang digunakan berkualitas baik dan mikroskop difokuskan dengan benar.
5. Kontras adalah perbedaan kecerahan atau warna antara objek yang diamati dengan latar belakangnya. Kontras yang baik memungkinkan detail objek terlihat jelas dan mudah dibedakan dari sekitarnya (Baker, J. R.,1958).

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer yang diperoleh secara langsung oleh peneliti di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta (Sugiyono, 2013).

Data didapatkan dari hasil penilaian berdasarkan skor pengamatan sediaan bakteri Gram positif dan negatif yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang diwarnani dengan pewarna Gram kemudian diamati dengan minyak bunga matahari dan minyak imersi berdasarkan hasil ketajaman, kontras dan kecerahan yang dihasilkan.

2. Teknik Pengumpulan data

Teknik pengumpulan data berdasarkan hasil penilaian dari beberapa responden yang ahli dalam bidang mikrobiologi dengan melakukan penilaian kualitas hasil gambar dari pengamatan mikroskopis sediaan bakteri Gram positif dan negatif yang diamati dengan minyak bunga matahari dibandingkan minyak imersi berdasarkan hasil ketajaman, kontras dan kecerahan yang dihasilkan. Kriteria skor penilaian ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kriteria Skor Penelitian

Aspek	Skor	Kriteria	Keterangan
Ketajaman gambar	1	Kurang jelas	Gambar buram, detail bakteri tidak dapat diidentifikasi dengan jelas
	2	Cukup jelas	Gambar cukup tajam, beberapa detail bakteri terlihat, tetapi sebagian kurang jelas
	3	Jelas	Gambar sangat tajam, semua detail bakteri terlihat dengan jelas tanpa keburaman
Kontras gambar	1	Kurang jelas	Kontras rendah, bakteri sulit dibedakan dari latar belakang
	2	Cukup jelas	Kontras cukup, bakteri terlihat, tetapi kurang mencolok dibandingkan latar belakang
	3	Jelas	Kontras tinggi, bakteri sangat jelas terlihat dan mudah dibedakan dari latar belakang
Kecerahan gambar	1	Kurang jelas	Gambar terlalu gelap atau terlalu terang sehingga sulit diamati
	2	Cukup jelas	Kecerahan cukup, bakteri terlihat, tetapi memerlukan penyesuaian tambahan pada mikroskop
	3	Jelas	Kecerahan optimal, bakteri terlihat jelas tanpa memerlukan penyesuaian tambahan

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat:

- a. Mikroskop
- b. Gelas kimia
- c. Erlenmeyer

- d. Timbangan neraca
 - e. Ose
 - f. Inkubator
 - g. Spirtus
 - h. Rak pewarnaan
 - i. Rak tabung reaksi
 - j. Tabung reaksi
 - k. Pipet tetes
 - l. Kertas
 - m. Kapas
 - n. Gelas ukur
 - o. Oven
 - p. *Objek glass*
 - q. *Deck glass*
 - r. Tisu lensa
2. Bahan
- a. Biakan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*
 - b. Media isolat *Nutrient Agar* (NA)
 - c. Minyak bunga Matahari
 - d. Minyak Imersi
 - e. Aquadest
 - f. Nacl isotonis

- g. Naoh
- h. Pewarna gram A, B, C dan D
- i. Entelan

I. Prosedur

1. Tahap perizinan

a. Perizinan

Melakukan perizinan dan pengajuan *etichal clearance* penelitian di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

b. Pemilihan Minyak Bunga Matahari

Kualitas minyak bunga matahari dipilih berdasarkan angka indeks bias yang mendekati indeks bias kaca yang diperoleh dari supermarket terdekat.

c. Pengadaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Sampel bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi (BLKK).

d. Pengadaan Minyak Imersi dan Pewarna Gram

Minyak Imersi dan Pewarna gram diperoleh dari kampus Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

e. Sterilisasi alat

- 1) Mencuci seluruh peralatan yang akan digunakan

- 2) Mengeringkan seluruh alat yang telah dicuci
 - 3) Membungkus seluruh alat yang telah dicuci dan dikeringkan menggunakan kertas dan memasukkannya ke dalam oven dengan suhu 1100C dalam waktu 8 jam.
- f. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
- 1) Menimbang NA sebanyak 4 gram, kemudian memasukkannya ke dalam erlenmeyer 250 ml
 - 2) Menambah kondensat AC sebanyak 200 ml ke dalam erlenmeyer lalu menghomogenkannya
 - 3) Menutup erlenmeyer dengan kapas, kertas, dan mengemas erlenmeyer dengan plastik
 - 4) Mensterilkan erlenmeyer tersebut menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm
 - 5) Menunggu beberapa saat hingga suhu turun ketika sterilisasi sudah 15 menit
 - 6) Menuangkan larutan pada erlenmeyer pada *disposable plate* secara aseptik $\pm$ 5 ml per tabung
 - 7) Menunggu hingga media memadat
 - 8) Membungkus media yang telah memadat dengan kertas
 - 9) Menyimpan media ke dalam kulkas.

g. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Mengambil sekitar 1 ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* murni
- 2) Menginokulasikan biakan ke media NA tabung secara zig-zag
- 3) Menginkubasi hasil inokulasi bakteri pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam

h. Peremajaan bakteri *Escherichia coli*

- 1) Mengambil sekitar 1 ose biakan bakteri *Escherichia coli* murni
- 2) Menginokulasikan biakan ke media NA tabung secara zig-zag
- 3) Menginkubasi hasil inokulasi bakteri pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam

i. Pembuatan NaCl Fisiologis

- 1) Menimbang 0,85 gram NaCl murni, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer
- 2) Menambah akuades sebanyak 100 ml hingga NaCl terlarut sempurna
- 3) Mengatur pH larutan NaCl menggunakan NaOH dan HCl hingga larutan pH 7
- 4) Menutup larutan menggunakan kapas dan plastik kemudian mensterilkannya menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit 1 atm.

j. Pembuatan preparat bakteri

- 1) Mengambil NaCl fisiologis menggunakan ose dan letakkan diatas *object glass*
- 2) Mengambil suspensi bakteri dari media NA menggunakan ose dan letakkan diatas *object glass* yang telah diberi NaCl
- 3) Campurkan keduanya dan ratakan
- 4) Biarkan suspensi bakteri hingga kering pada suhu ruang

k. Pewarnaan

- 1) Preparat bakteri yang telah kering kemudian dilakukan pewarnaan sebagai berikut:
 - a) Ditetaskan cat gram A yaitu kristal violet sebagai cat utama dan tunggu selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest
 - b) Ditetaskan cat gram B yaitu lugol sebagai penguat dan tunggu selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest
 - c) Ditetaskan cat gram C yaitu alcohol sebagai peluntur selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest
 - d) Ditetaskan cat gram D yaitu safranin sebagai penutup selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest
- 2) Dibersihkan sisa cat dengan tisu dan tunggu hingga kering

l. Pemasangan Entelan

- 1) Dikeringkan preparat yang telah diwarnai
- 2) Ditetaskan secukupnya entelan di atas preparat
- 3) Diletakkan deck glass dengan pinset secara perlahan
- 4) Tekan deck glass agar entelan menyebar

- 5) Ratakan dan tunggu preparat hingga kering

m. Pemilihan mikroskop

- 1) Pilih mikroskop dengan kualitas terbaik
- 2) Pilih mikroskop dengan pencahayaan yang bagus
- 3) Pilih mikroskop dengan lensa yang tidak rusak atau kotor, apabila kotor dapat dibersihkan terlebih dahulu
- 4) Pilih mikroskop yang memiliki mode fokus *mikrometer* dan *makrometer* yang baik

2. Tahap pelaksanaan

a. Penilaian kualitas dari sediaan bakteri dengan minyak imersi

- 1) Disiapkan alat dan bahan
- 2) Sediaan bakteri yang telah diwarnai ditetesi 1 tetes minyak imersi
- 3) Letakkan sediaan dimeja preparat
- 4) Dilakukan pengamatan sediaan dengan perbesaran kuat 100x
- 5) Melakukan penilaian berdasarkan skor ketajaman, kontras dan kecerahan sesuai dengan panduan

b. Penilaian kualitas dari sediaan bakteri dengan minyak bunga matahari

- 1) Disiapkan alat dan bahan
- 2) Sediaan bakteri yang telah diwarnai ditetesi 1 tetes minyak bunga matahari
- 3) Letakkan sediaan dimeja preparat
- 4) Dilakukan pengamatan sediaan dengan perbesaran kuat 100x

- 5) Melakukan penilaian berdasarkan skor ketajaman, kontras dan kecerahan sesuai dengan panduan

J. Manajemen data

1. Penyajian Data

Data dari hasil penelitian ini akan disajikan dalam bentuk visualisasi gambar, tabel skor dan diagram. Terdapat sebuah tabel yaitu tabel hasil skor penilaian yang berisi skala skor 1 sampai 3 untuk penilaian minyak imersi dan minyak bunga matahari. Penilaian meliputi parameter standar yang dinilai pada hasil pengamatan dari kedua minyak yang meliputi ketajaman, kontras dan kecerahan. Tabel akan berisi 60 data dengan masing-masing preparat gram negatif dan gram positif 30 data. Data dalam bentuk diagram menunjukkan hasil rata-rata skor yang diperoleh dari tabel skor hasil penilaian.

2. Analisis Deskriptif

Analisis data dilakukan setelah data dalam bentuk tabel skor penilaian disajikan. Dari data tabel tersebut kemudian dijelaskan secara deskriptif hasil pengamatan mikroskopis sediaan bakteri dengan minyak imersi dan minyak bunga matahari. Kemudian kedua data dibandingkan untuk mengetahui kelayakan minyak bunga matahari sebagai alternatif pengganti minyak imersi dalam pengamatan mikroskopis perbesaran kuat 100x.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh Surat Keterangan Layak Etik Nomor DP.04.03/e-KEPK.1/403/2025 dari Komite Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.