

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni, yaitu suatu jenis penelitian yang bertujuan untuk mengukur pengaruh suatu perlakuan terhadap variabel tertentu, dimana seluruh proses dilakukan dalam kondisi yang terkendali. Eksperimen murni memiliki ciri-ciri yaitu adanya kelompok kontrol dan variabel luar yang dikendalikan oleh peneliti (Notoatmodjo, 2010; Sugiyono, 2013).

Pada penelitian ini, diberikan perlakuan atau intervensi terhadap isolat bakteri *Escherichia coli*, yaitu dengan menguji sensitivitasnya terhadap antibiotik kloramfenikol dengan metode difusi sumuran dan cakram. Perlakuan tersebut menghasilkan zona hambat yang selanjutnya diukur menggunakan jangka sorong.

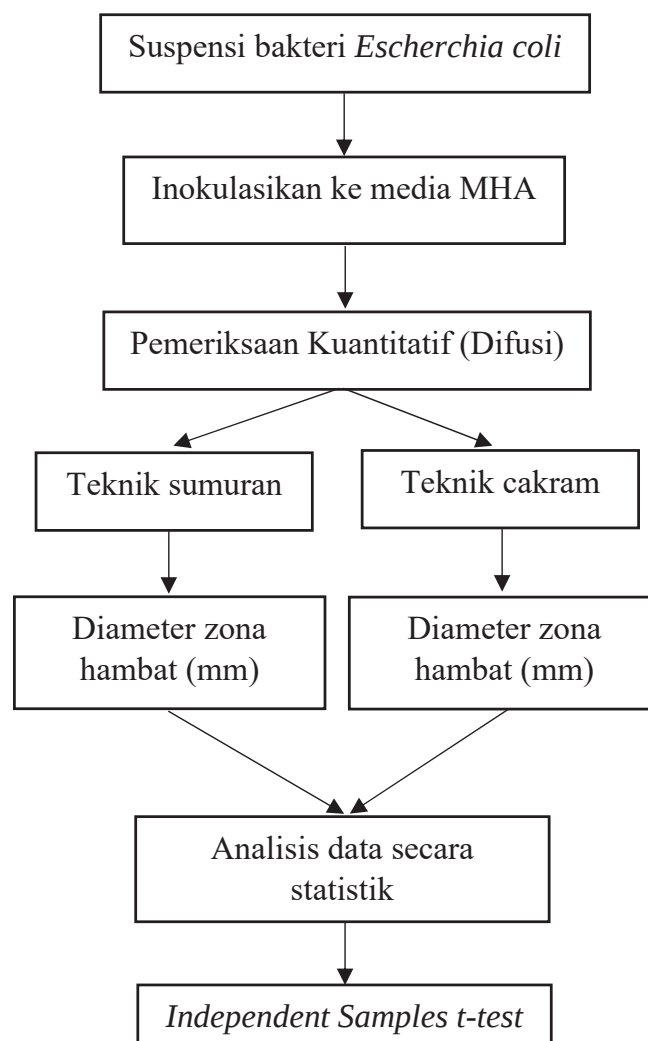
2. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *Posttest Only Control Group Design*, yang mencakup dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Pengukuran hasil dilakukan setelah perlakuan diberikan, tanpa adanya pengukuran awal. Hal ini didasarkan pada asumsi bahwa kedua kelompok memiliki kondisi awal yang sama, sehingga evaluasi cukup dilakukan pasca perlakuan untuk mengetahui efeknya secara langsung (Notoatmodjo, 2010). Kelompok pertama

adalah kelompok yang diberikan perlakuan, yaitu antibiotik kloramfenikol yang dilarutkan dan diuji sensitivitasnya menggunakan teknik sumuran. Sementara kelompok yang kedua adalah kelompok yang tidak diberikan perlakuan, yaitu uji sensitivitas dengan teknik cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg dan kontrol negatif (kertas cakram yang diberi aquadest). Hasil pengukuran dari setiap kelompok dibandingkan sehingga dapat dilihat ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. Alur Penelitian

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.

2. Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol dan diameter zona hambat.

3. Besar Sampel

Agar penelitian lebih dipercaya, maka diperlukan suatu pengulangan. Minimal pengulangan dapat dihitung dengan rumus Ferderer. Rumus ferderer yang digunakan adalah:

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

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

15 = derajat kebebasan umum

Penelitian ini dilakukan dengan dua pengukuran, yaitu pengukuran zona hambat metode difusi sumuran dan cakram. Minimal pengulangan yang harus dilakukan adalah:

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

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

$$t - 1 \geq 15$$

$$t \geq 15 + 1$$

$$t \geq 16$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, minimal pengulangan dilakukan minimal sebanyak 16 kali. Pengulangan pada penelitian ini sebanyak 16 kali pada metode difusi sumuran dan cakram, sehingga diperoleh total 32 data.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 14-26 April 2025.

2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*variable independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol yang diuji dengan metode difusi sumuran dan cakram.

2. Variabel terikat (*variable dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil pemeriksaan sensitivitas bakteri *Escherichia coli* terhadap antibiotik kloramfenikol.

3. Variabel terkontrol

- a. Kontaminan
- b. Ketebalan media
- c. Kekeruhan suspensi bakteri
- d. Suhu
- e. Waktu inkubasi

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat atau dependen (Sugiyono, 2013). Variabel bebas pada penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol yang diuji dengan metode difusi sumuran dan cakram.

- a. Metode difusi sumuran adalah metode pada uji sensitivitas untuk menentukan diameter zona hambat dengan menggunakan lubang sumuran sebagai tempat diberikannya antibiotik.

Satuan : mm

Skala : rasio

- b. Metode difusi cakram adalah metode pada uji sensitivitas untuk menentukan diameter zona hambat dengan menggunakan cakram sebagai tempat diberikannya antibiotik.

Satuan : mm

Skala : rasio

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah suatu variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat timbul sebagai akibat dari variabel bebas (Sugiyono, 2013).

- a. Diameter zona hambat adalah zona jernih yang terbentuk di sekitar cakram antibiotik atau lubang sumuran dan dapat diukur menggunakan jangka sorong.

Satuan : mm

Skala : rasio

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang berasal dari luar, namun tetap dijaga oleh peneliti agar tidak mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat (Budijanto, 1994).

- a. Kontaminan adalah bakteri atau jamur selain bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada media MHA dan dapat mempengaruhi hasil. Dikendalikan dengan cara sterilisasi alat dan bahan serta metode aseptis.
- b. Ketebalan media adalah ukuran tebal media MHA yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Variabel ini dikendalikan dengan menyamakan volume media saat dibuat, yaitu 20 ml media MHA pada setiap cawan petri.

- c. Kekeruhan suspensi bakteri adalah tingkat kekeruhan bakteri yang diinokulasikan ke dalam NaCl fisiologis. Hal ini dapat dikendalikan dengan cara membandingkannya dengan standar kekeruhan McFarland.
- d. Suhu inkubasi adalah derajat panas suatu inkubator. Hal ini dapat dikendalikan dengan mengatur suhu inkubator sesuai dengan aturan yang ditentukan.
- e. Waktu inkubasi adalah rentang waktu antara inokulasi bakteri sampai pertumbuhan koloni dengan karakteristik tertentu. Hal ini dapat dikendalikan dengan waktu inkubasi yang tepat dan tidak melebihi waktu yang ditentukan.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini merupakan data primer, yaitu data yang dikumpulkan secara langsung oleh peneliti dari obyek penelitian (Sugiyono, 2013). Data didapatkan dari pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* terhadap antibiotik kloramfenikol dengan menggunakan metode difusi sumuran dan cakram.

H. Alat Ukur/Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| a. Cawan petri <i>disposable</i> | k. Tabung reaksi |
| b. Gelas ukur | l. Rak tabung |
| c. Neraca analitik | m. Jangka sorong |
| d. Batang pengaduk | n. Mikropipet |

- | | |
|--|----------------------|
| e. Kertas timbang | o. <i>Yellow tip</i> |
| f. Alat pelubang | p. Inkubator |
| g. Autoklaf | q. Tabung tutup ulir |
| h. Cotton swab | r. Pinset |
| i. Bunsen | s. Beker glass |
| j. Standar kekeruhan yang setara dengan 0,5 McFarland atau 10^8 CFU/ml | t. Oven |

2. Bahan

- a. Isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922
- b. *Disk* antibiotik kloramfenikol 30 μ g
- c. Antibiotik Kloramfenikol
- d. *Blanc disk*
- e. Media Muller Hinton Agar (MHA)
- f. NaCl Fisiologis
- g. Aquadest
- h. BaCl₂ 1%
- i. H₂SO₄ 1%

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas dan reliabilitas terhadap instrumen penelitian merupakan langkah penting untuk menjamin bahwa data yang dikumpulkan valid dan reliabel. Instrumen yang valid adalah alat ukur yang mampu mengukur apa yang seharusnya diukur. Sehingga diperoleh hasil data yang valid, yaitu nilai

yang terukur pada alat sama dengan nilai sebenarnya. Sementara itu, instrumen yang reliabel adalah alat ukur memberikan hasil pengukuran yang tetap dan konsisten pada pengukuran berulang (Notoatmodjo, 2010).

Penelitian ini menggunakan jangka sorong sebagai alat ukur diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dan dinyatakan dalam satuan milimeter. Diameter zona hambat diukur dari tepi atas ke tepi bawah zona jernih dengan melewati bagian tengah obat. Pengulangan pengukuran dilakukan masing-masing sebanyak 16 kali pada metode difusi sumuran dan 16 kali pada metode difusi cakram.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Melakukan izin menggunakan Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

- b. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan untuk pemeriksaan perlu disterilisasi dengan cara mencuci alat kemudian dikeringkan. Selanjutnya alat dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam oven selama 24 jam pada suhu 100⁰C di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

- c. Sterilisasi aquadest

Aquadest dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan kertas. Selanjutnya diberi plastik dan diikat dengan

tali rafia. Erlenmeyer yang berisi aquadest dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

d. Pembuatan NaCl Fisiologis

- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Ditimbang serbuk NaCl sebanyak 0,85-9 gram.
- 3) Dilarutkan NaCl yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu takar dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest.
- 4) Diatur pH larutan menjadi 7,0 dengan 0,1 N NaOH dan 0,1 N HCl.
- 5) Disaring larutan NaCl dan ditampung pada labu erlenmeyer.
- 6) Disterilkan larutan NaCl menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 7) Dimasukkan larutan NaCl ke dalam tabung reaksi untuk membuat suspensi bakteri *Escherichia coli*.

e. Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Ditimbang media MHA sebanyak 15,2 gr.
- 3) Dimasukkan serbuk MHA ke dalam erlenmeyer.
- 4) Serbuk MHA dilarutkan dalam 400 ml aquadest dan dicampur dalam keadaan hangat sampai homogen.
- 5) Ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kapas dan kertas kemudian diberi plastik dan diikat dengan tali rafia.

- 6) Disterilkan media MHA ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 7) Dibiarkan suhu media MHA mencapai $45-50^{\circ}\text{C}$ kemudian dituang pada cawan petri disposable dengan volume masing-masing sebanyak 20 ml.
 - 8) Setelah dingin, media dibungkus menggunakan kertas kemudian disimpan pada lemari es.
- f. Pembuatan standar kekeruhan Mc Farland 0,5 atau setara dengan 10^8 CFU/ml
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Dibuat larutan BaCl_2 1% dengan cara ditimbang serbuk BaCl_2 sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest.
 - 3) Dibuat larutan H_2SO_4 1% dengan cara dipipet 1,04 ml asam sulfat pekat dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest.
 - 4) Dibuat standar kekeruhan Mc Farland dengan cara dicampurkan 0,05 ml BaCl_2 1% dan 9,5 ml H_2SO_4 1%.
 - 5) Diukur larutan standar kekeruhan Mc Farland menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600-625 nm dengan absorban standar 0,08-0,1. Apabila nilai absorbannya $< 0,08$ maka ditambahkan dengan suspensi bakteri, sedangkan apabila melebihi $> 0,1$ maka ditambahkan NaCl Fisiologis.

- 6) Dimasukkan larutan standar Mc Farland kekeruhan ke dalam tabung tutup ulir dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
- g. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli*
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Diambil 1 ujung ose koloni bakteri dari media subkultur kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland.
 - 3) Dibandingkan tabung suspensi bakteri dengan tabung standar dengan cara dipegang tabung secara berhimpitan. Kemudian kekeruhannya dibandingkan dengan latar belakang kertas putih. Apabila kurang keruh maka ditambah dengan koloni, sedangkan kalau lebih keruh maka ditambah larutan NaCl fisiologis.
- h. Pembuatan larutan antibiotik kloramfenikol

O'Neil, MJ; Nowara, dkk., (1997) menjelaskan bahwa aquadest dapat digunakan sebagai pelarut antibiotik kloramfenikol. Pelarut untuk antibiotik ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pelarut Antibiotik

Antibiotik	Kelarutan	Pelarut
Kloramfenikol	2500 mg/L	Aquadest
Siprofloksasin	30000 mg/L	Aquadest
Gentamisin	100 mg/L	Aquadest

Sumber: Faisal dan Permana, 2020.

- 1) Larutan antibiotik konsentrasi 30 µg/50 µl
 - a) Ditimbang 0,030 g antibiotik kloramfenikol

- b) Dilarutkan antibiotik ke dalam 50 ml aquadest steril. Adapun perhitungan pembuatan larutan antibiotik adalah sebagai berikut:

$$30 \mu g = 50 \mu l$$

$$300 mg = 500 ml$$

$$\frac{300 mg}{500 ml} = \frac{60 mg}{100 ml} = 60 mg\%$$

Tiap sumuran diisi 50 μl dari larutan 100 ml maka konsentrasinya setara dengan 30 mcg

$$= \frac{60 mg}{2000} = 0,03 mg = 30 \mu g$$

- c) Dihomogenkan larutan.
- d) Setiap lubang sumuran diisi dengan 50 μl larutan antibiotik.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji sensitivitas teknik sumuran

- 1) Dichelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri yang telah distandarisasi kekeruhannya.
- 2) Ditunggu hingga cairan meresap ke dalam kapas.
- 3) Diangkat lidi kapas dan diperas dengan ditekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.
- 4) Digoreskan pada media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan. Goresan dilakukan sebanyak tiga kali dan lidi kapas dibolak-balik. Dari goresan ke I ke goresan ke II, cawan

petri diputar 90^0 sedangkan dari goresan ke II ke goresan ke III, cawan petri diputar 45^0 .

- 5) Dibiarkan MHA plate di atas meja selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam agar-agar.
 - 6) Dibuat lubang sumuran pada media MHA dengan menggunakan sedotan stainless sebagai pengganti alat cork borer.
 - 7) Dipipet 50 μ l larutan antibiotik kloramfenikol 30 μ g pada masing-masing lubang sumuran sebanyak 16 kali ulangan.
 - 8) Cawan petri ditutup dan dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37^0C selama 16-18 jam.
- b. Uji sensitivitas teknik cakram
- 1) Dichelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri yang telah distandarisasi kekeruhannya.
 - 2) Ditunggu hingga cairan meresap ke dalam kapas.
 - 3) Diangkat lidi kapas dan diperas dengan ditekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.
 - 4) Digoreskan pada media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan. Goresan dilakukan sebanyak tiga kali dan lidi kapas dibolak-balik. Dari goresan ke I ke goresan ke II, cawan petri diputar 90^0 sedangkan dari goresan ke II ke goresan ke III, cawan petri diputar 45^0 .
 - 5) Dibiarkan MHA plate di atas meja selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam media agar.

- 6) Ditempelkan dan ditekan antibiotik *disk* konsentrasi 30 µg pada media MHA dengan menggunakan pinset sebanyak 16 kali ulangan.
- 7) Cawan petri ditutup dan dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

3. Tahap Pengamatan

a. Pengamatan teknik sumuran

- 1) Dikeluarkan cawan petri dari inkubator.
- 2) Dilakukan pengamatan hasil dan diukur diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.
- 3) Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih disekitar lubang sumuran (tidak terdapat pertumbuhan bakteri). Hasilnya dicatat dengan satuan milimeter (mm).

b. Pengamatan teknik cakram

- 1) Dikeluarkan cawan petri dari inkubator.
- 2) Dilakukan pengamatan hasil dan diukur diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.
- 3) Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih disekitar *disk* (tidak terdapat pertumbuhan bakteri). Hasilnya dicatat dengan satuan milimeter (mm).

K. Manajemen Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis menggunakan analisis deskriptif, analisis analitik dan analisis statistik. Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan perbedaan diameter zona hamat antara teknik sumuran dan cakram, yang kemudian disajikan dalam bentuk diagram batang. Analisis analitik digunakan untuk mengetahui kategori diameter zona hambat dan analisis statistik digunakan untuk menarik kesimpulan umum dari data sampel yang mewakili populasi.

1. Penyajian data

Pengolahan data dilakukan setelah seluruh data dari pengukuran zona hambat terkumpul dan disajikan dalam tabel data primer.

2. Analisis deskriptif

Data rerata yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram batang dan dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui perbedaan diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* antara teknik sumuran dan cakram.

3. Analisa analitik

Analisis analitik dilakukan dengan membandingkan data rerata diameter zona hambat yang dihasilkan pada teknik sumuran dan cakram dengan tabel CLSI. Sehingga dapat diketahui kategori zona hambat antibiotik yang digunakan.

4. Analisa statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 16.0 yang dijalankan pada *platform windows*. Analisis data dapat

dilakukan dengan menggunakan uji *Independent T-test* atau *Mann-Whitney*. Uji *Independent T-test* apabila data memiliki distribusi normal dan data homogen, maka dilakukan uji homogenitas data terlebih dahulu. Uji *Mann-Whitney* digunakan apabila salah satu atau kedua syarat tidak terpenuhi.

a. Uji normalitas data

Data yang diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat dari seluruh kelompok dimasukkan ke dalam aplikasi SPSS 16.0. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* dikarenakan data ≤ 50 . Uji normalitas data bertujuan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. H_0 diterima apabila nilai signifikan (sig) $\geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila nilai signifikan (sig) $< 0,05$.

H_0 : data berdistribusi normal

H_a : data tidak berdistribusi normal

b. Uji homogenitas data

Uji homogenitas data bertujuan untuk mengetahui data yang dikumpulkan homogen atau tidak. H_0 diterima apabila nilai signifikan (sig) $\geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila nilai signifikan (sig) $< 0,05$.

H_0 : data homogen

H_a : data tidak homogen

c. Uji *Independent Samples t-Test*

Uji *Independent Samples t-Test* dilakukan apabila data berdistribusi normal dan homogen. Uji ini untuk mengetahui ada atau

tidaknya perbedaan zona hambat yang dihasilkan antara teknik sumuran dan teknik cakram. H_0 diterima apabila nilai signifikan (sig) $\geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila nilai signifikan (sig) $< 0,05$.

H_0 : Tidak ada perbedaan rerata diameter zona hambat teknik sumuran dan cakram pada pemeriksaan sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap kloramfenikol

H_a : Ada perbedaan rerata diameter zona hambat teknik sumuran dan cakram pada pemeriksaan sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap kloramfenikol

d. Uji *Mann-Whitney*

Uji *Mann-Whitney* dilakukan apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Uji ini untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan zona hambat yang dihasilkan antara metode difusi cakram dan sumuran. H_0 diterima apabila nilai signifikan (sig) $\geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila nilai signifikan (sig) $< 0,05$.

H_0 : Tidak ada perbedaan rerata diameter zona hambat teknik sumuran dan cakram pada pemeriksaan sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap kloramfenikol

H_a : Ada perbedaan rerata diameter zona hambat teknik sumuran dan cakram pada pemeriksaan sensitivitas bakteri *E.coli* terhadap kloramfenikol

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan pembebasan persetujuan layak etik (*Ethical Exemption*) No.DP.04.03/e-KEPK.1/256/2025 dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Pembebasan ini berlaku sejak 17 Februari 2025 sampai 17 Februari 2026.

M. Kesulitan Penelitian

Terdapat kesulitan dalam pelaksanaan penelitian ini, yaitu diperlukan perlakuan yang sama pada teknik sumuran sehingga konsentrasi larutan antibiotik yang dimasukkan pada lubang sumuran memiliki konsentrasi yang sebanding dengan konsentrasi cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg.