

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen murni. Eksperimen murni adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk menilai dampak perlakuan pada variabel tertentu dalam situasi yang terkontrol (Sugiyono, 2020). Eksperimen murni memiliki ciri-ciri adanya kelompok kontrol, pemilihan sampel secara acak atau randomisasi dan variabel luar yang dikontrol oleh peneliti (Notoatmodjo, 2010).

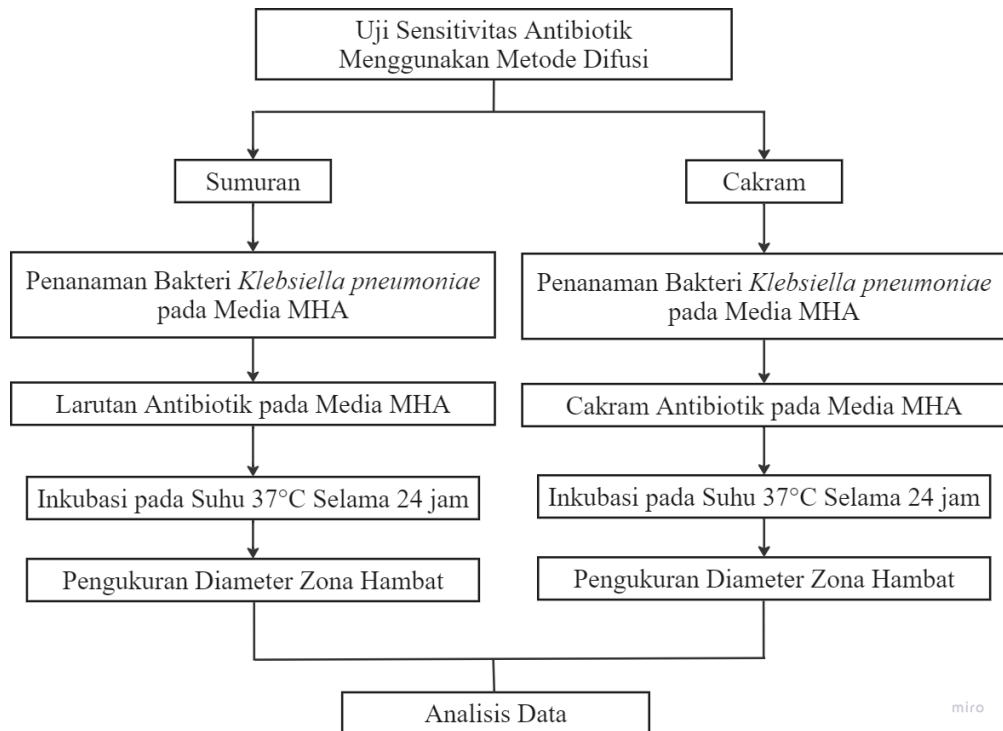
Desain penelitian menggunakan *Posttest-only Control Group Design*. Desain ini memilih subjek secara acak atau randomisasi dan dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kontrol dan eksperimental. Hanya kelompok eksperimental yang diberi perlakuan (Louise, 2022).

Kelompok kontrol pada penelitian ini adalah metode difusi cakram. Kelompok eksperimental pada penelitian ini adalah metode difusi sumuran.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian adalah serangkaian langkah yang dilakukan dalam pelaksanaan penelitian. Proses penelitian ini dilakukan dengan cara yang sistematis, objektif dan logis. Sistematis berarti penelitian dilaksanakan dalam urutan yang terencana dan mengikuti pedoman atau norma. Objektif artinya penelitian berdasarkan pada data dan fakta. Logis berarti penelitian berlandaskan kajian yang rasional, kritis dan analisis. Alur penelitian

dimulai dari identifikasi masalah hingga menjadi sebuah laporan penelitian (Sukmawati dkk., 2023). Alur penelitian ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Populasi dan Sampel

1. Obyek penelitian

Obyek penelitian adalah diameter zona hambat.

2. Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah biakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Biologi UGM.

3. Banyak Pengulangan Sampel

Pengulangan perlakuan penelitian ditetapkan berdasarkan rumus Federer (Budijanto, 2013) yaitu:

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

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

15 = derajat kebebasan umum

Dengan dua perlakuan yaitu metode difusi cakram dan metode difusi sumuran, maka pengulangan yang dilakukan sebanyak:

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

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

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

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

$$r \geq 16$$

Dari hasil perhitungan di atas, pengulangan didapatkan minimal 16 kali untuk tiap perlakuan.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan April 2025.

2. Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode pengujian antibiotik dengan metode difusi cakram dan sumuran.

2. Variabel terikat

Variabel terikat yang diteliti dalam penelitian adalah hasil pengukuran zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

3. Variabel pengganggu (sudah dikendalikan)

Variabel pengganggu yang sudah dikendalikan dalam penelitian adalah kontaminasi, ketebalan media, kekeruhan suspensi bakteri dan suhu inkubasi.

F. Definisi Konsep dan Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat, baik secara positif maupun negatif (Fitrah dan Luthfiyah, 2018).

- a. Metode difusi cakram adalah metode untuk mengetahui diameter zona hambat bakteri dengan memanfaatkan kertas cakram sebagai media untuk penempatan antibiotik. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran diameter zona hambat merupakan bilangan dengan skala rasio yang dinyatakan dalam mm.

b. Metode difusi sumuran adalah metode untuk mengetahui zona hambat bakteri dengan membuat lubang pada media agar untuk penempatan antibiotik. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran diameter zona hambat merupakan bilangan dengan skala rasio yang dinyatakan dalam mm.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau disebabkan variabel lainnya dan merupakan variabel yang menjadi perhatian utama dalam penelitian (Fitrah dan Luthfiyah, 2018).

a. Diameter zona hambat merupakan area bersih yang mengelilingi kertas cakram pada media agar, yang menunjukkan reaksi bakteri terhadap zat antibiotik yang diuji. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran merupakan bilangan dengan skala rasio yang dinyatakan dalam mm.

3. Variabel pengganggu (sudah dikendalikan)

Variabel pengganggu adalah variabel yang bisa mengubah pola hubungan antara variabel bebas dan terikat (Roflin dkk., 2021).

a. Kontaminasi

Kontaminasi adalah jamur atau bakteri lain yang dapat tumbuh di media. Hal tersebut mengakibatkan hasil uji tidak akurat karena sulit membedakan antara efek antibiotik pada bakteri uji.

Pengendalian kontaminasi dilakukan melalui proses sterilisasi peralatan dan bahan serta penerapan metode aseptis.

b. Ketebalan media

Ketebalan media adalah ukuran ketebalan media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menyebabkan antibiotik sulit berdifusi pada media. Pengendalian ketebalan media dilakukan dengan menyeragamkan volume media pada tiap cawan petri.

c. Kekeruhan suspensi bakteri

Kekeruhan suspensi bakteri adalah tingkat kekeruhan dari bakteri yang diinokulasikan ke dalam NaCl fisiologis. Kekeruhan suspensi bakteri dapat memengaruhi hasil diameter zona hambat. Suspensi terlalu pekat mengakibatkan diameter zona hambat lebih kecil sehingga terjadi resistensi palsu. Suspensi terlalu encer menyebabkan diameter zona hambat lebih besar sehingga hasil menjadi sensitif palsu. Pengendalian kekeruhan suspensi bakteri dilakukan dengan menyesuaikan standar McFarland.

d. Suhu inkubasi

Suhu inkubasi adalah tingkat panas yang ada dalam inkubator. suhu inkubasi dapat memengaruhi hasil diameter zona hambat. Suhu inkubasi terlalu tinggi mengakibatkan diameter zona hambat lebih kecil sehingga terjadi resistensi palsu. Suhu inkubasi rendah menyebabkan diameter zona hambat lebih besar sehingga hasil

menjadi sensitif palsu. Pengendalian dilakukan dengan mengatur suhu berdasarkan pedoman standar dan pemantauan.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Pada penelitian ini menggunakan jenis pengumpulan data primer. Data primer merupakan data asli yang dikumpulkan oleh peneliti secara langsung (Ahmad dkk., 2024). Data didapatkan dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan metode difusi cakram dan sumuran.

H. Alat Ukur dan Bahan Penelitian

1. Alat

- | | |
|--------------------|------------------------------------|
| a. Alat pelubang | k. Labu erlenmeyer |
| b. Autoklaf | l. Mikropipet |
| c. Batang pengaduk | m. Neraca analitik |
| d. Bunsen | n. Ose bulat |
| e. Cawan petri | o. Pinset |
| f. Cotton swab | p. Rak tabung |
| g. Gelas ukur | q. Standar kekeruhan McFarland 0,5 |
| h. Inkubator | r. Tabung <i>screw cap</i> |
| i. Jangka sorong | s. Tabung reaksi |
| j. Kertas timbang | t. <i>Yellow tip</i> |

2. Bahan Penelitian

- a. Media *Mueller Hinton Agar*
- b. Akuades

- c. Antibiotik meropenem
- d. Disk antibiotik meropenem
- e. Isolat *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495
- f. NaCl fisiologis

I. Uji Validitas Instrumen

Validitas adalah kemampuan suatu alat ukur untuk mengukur sasaran ukur (Darma, 2021). Uji validitas merupakan ukuran yang menunjukkan ketepatan suatu instrument. Instrumen dikatakan valid apabila instrumen benar-benar berfungsi sebagai alat pengukur (Hidayatullah dkk., 2023). Penelitian ini menggunakan alat ukur jangka sorong untuk mengukur diameter zona hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan Penelitian

- a. Melakukan izin menggunakan Laboratorium Bakteriologi Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.
- b. Mempersiapkan bahan dan alat penelitian.

1) Sterilisasi alat

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian harus disetrlisasi dengan cara mencuci peralatan tersebut, mengeringkannya dan membungkusnya dengan kertas. Setelah itu, peralatan tersebut ditempatkan di dalam oven selama 24

jam pada suhu 100°C di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2) Sterilisasi akuades

Akuades ditempatkan ke dalam labu erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas dan kertas sebelum ditutup plastik dan diikat rafia. Akuades dimasukkan ke dalam *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit.

3) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*

- a) Dilakukan sterilisasi meja kerja dengan desinfeksi.
- b) Disiapkan alat dan bahan yang hendak digunakan.
- c) Ditimbang bubuk media *Mueller Hinton Agar*.
- d) Dimasukkan bubuk media ke dalam labu erlenmeyer dan tambahkan akuades.
- e) Dipanaskan media *Mueller Hinton Agar* hingga bahan larut dengan baik.
- f) Ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kapas dan kertas kemudian beri plastik dan ikat dengan tali rafia.
- g) Disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- h) Biarkan suhu media menjadi hangat, sekitar 45°C-50°C.
- i) Tuang ke dalam cawan petri yang sudah disterilisasi masing-masing 20 ml.

- j) Dibiarkan media memadat dan simpan pada suhu 2-8°C.

4) Pembuatan Standar Kekeruhan McFarland

- a) Disiapkan alat dan bahan yang hendak digunakan.
- b) Dilakukan pemijaran ose sebelum digunakan untuk mengambil koloni bakteri.
- c) Dilakukan pengambilan koloni bakteri dengan satu ose koloni dari media subkultur ke tabung reaksi berisi larutan NaCl fisiologis.
- d) Disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan standar McFarland.

2. Tahap Pelaksanaan penelitian

- a. Melakukan uji sensitivitas *Klebsiella pneumoniae* terhadap antibiotik meropenem dengan metode difusi cakram dan sumuran.

Tabel 2. Tahap Pelaksanaan Uji Sensitivitas

Metode Difusi Sumuran	Metode Difusi Cakram
1) Disiapkan lidi kapas steril untuk mengambil bakteri dengan kekeruhan yang sudah distandarisasi.	1) Disiapkan lidi kapas steril untuk mengambil bakteri dengan kekeruhan yang sudah distandarisasi.
2) Ditunggu hingga suspensi bakteri terserap ke dalam kapas.	2) Ditunggu hingga suspensi bakteri terserap ke dalam kapas.
3) Diangkat lidi kapas dan diperas dengan menekan kapas ke dinding tabung.	3) Diangkat lidi kapas dan diperas dengan menekan kapas ke dinding tabung.

Metode Difusi Sumuran	Metode Difusi Cakram
4) Digoreskan suspensi bakteri pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> hingga hampir seluruh permukaan media tertutup.	4) Digoreskan suspensi bakteri pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> hingga hampir seluruh permukaan media tertutup.
5) Dibuat lubang sumuran pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> menggunakan alat pelubang dengan diameter 6 mm sebagai pengganti borer steril.	5) Diletakkan cakram antibiotik meropenem pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> .
6) Dipipetkan antibiotik meropenem yang sudah dilarutkan dengan akuades pada tiap sumuran.	6) Cawan petri ditutup dengan rapat.
7) Cawan petri ditutup dengan rapat.	7) Dibungkus dengan kertas dan plastik.
8) Dibungkus dengan kertas dan plastik.	8) Diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam.
9) Diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam.	

3. Tahap Pengamatan

a. Melakukan pengamatan diameter zona hambat pada metode difusi cakram dan sumuran.

1) Metode difusi cakram

- a) Cawan petri dikeluarkan dari inkubator.
- b) Dilakukan pengamatan hasil dan pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.
- c) Diukur diameter zona hambat dari tepi atas ke tepi bawah daerah jernih dengan melewati antibiotik pada cakram.

2) Metode difusi sumuran

- a) Cawan petri dikeluarkan dari inkubator.
- b) Dilakukan pengamatan hasil dan pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.
- c) Diukur diameter zona hambat dari tepi atas ke tepi bawah daerah jernih dengan melewati antibiotik pada sumuran.

K. Manajemen Data

Data akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif, analitik dan statistik untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara hasil metode difusi cakram dan sumuran.

1. Penyajian data dan Analisis deskriptif

Penyajian data merupakan cara untuk mengumpulkan data hasil penelitian. Data yang diperoleh dicatat dan diorganisasi dalam bentuk tabel (Handayani, 2023).

Analisis deskriptif merupakan proses mengolah data yang telah dikumpulkan untuk memperoleh gambaran pola data. Data hasil pengukuran diameter zona hambat dapat disajikan dalam bentuk diagram (Sarmigi dkk., 2023).

2. Analisis analitik

Analisis analitik dilakukan dengan menentukan selisih rerata diameter zona hambat pada kedua metode dan persentasi perbedaan

pada metode difusi yang dibandingkan dengan rumus menurut (Nuzzo, 2018) :

$$\text{Persentase Perbedaan} = \frac{|\text{rerata sumuran} - \text{rerata cakram}|}{\left[\frac{\text{rerata sumuran} + \text{rerata cakram}}{2} \right]} \times 100\%$$

(Nuzzo, 2018)

Kisaran toleransi klinis ditetapkan sebesar $\pm 10\%$. Jika batas atas lebih besar dari 10% atau batas bawah persetujuan kurang dari -10% , tidak ada perbedaan yang dapat diterima secara klinis (Bland and Altman, 1999 dalam Erbe dkk., 2022).

3. Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS. Analisis dapat dilakukan dengan uji normalitas, uji homogenitas dan uji *Independent Sample t-test* atau *Mann-Whitney*. Uji *Independent Sample t-test* apabila data berdistribusi normal dan homogen. Uji *Mann-Whitney* apabila salah satu syarat uji *Independent Sample t-test* tidak terpenuhi.

a. Uji normalitas data

Data hasil pengukuran diameter zona hambat dari seluruh kelompok dimasukkan ke dalam program SPSS 16.0. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* dikarenakan data kurang dari sama dengan ($\leq$) 50. Uji normalitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. H_0 diterima apabila $\text{Sig} \geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila $\text{Sig} < 0,05$.

b. Uji homogenitas data

Uji homogenitas data dilakukan untuk mengetahui data pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan antara metode difusi sumuran dan metode difusi cakram homogen atau tidak. H_0 diterima apabila $\text{Sig} \geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila $\text{Sig} < 0,05$.

c. Uji *Independent Sample t-test*

Uji *Independent Samples t-test* dilakukan dengan syarat data berdistribusi normal dan homogen. Uji *Independent Samples t-test* bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan data pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan antara metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. H_0 diterima apabila $\text{Sig. (2-tailed)} \geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila $\text{Sig. (2-tailed)} < 0,05$.

d. Uji *Mann-Whitney*

Uji *Mann-Whitney* dilakukan apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Uji *Mann-Whitney* dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan zona hambat yang dihasilkan antara metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. H_0 diterima apabila $\text{Sig} \geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila $\text{Sig} < 0,05$.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh Surat Kelayakan Etik No.DP.04.03/e-KEPK.1/649/2025 dari pihak Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.