

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian eksperimen murni merupakan suatu metode penelitian yang bertujuan untuk menguji hubungan sebab-akibat dengan cara memanipulasi variabel independen dalam suatu lingkungan laboratorium yang sangat terkendali. Untuk menjaga validitas internal yang tinggi, subjek penelitian dibagi secara acak ke dalam kelompok eksperimen dan kelompok kontrol (Creswell & Creswell, 2018).

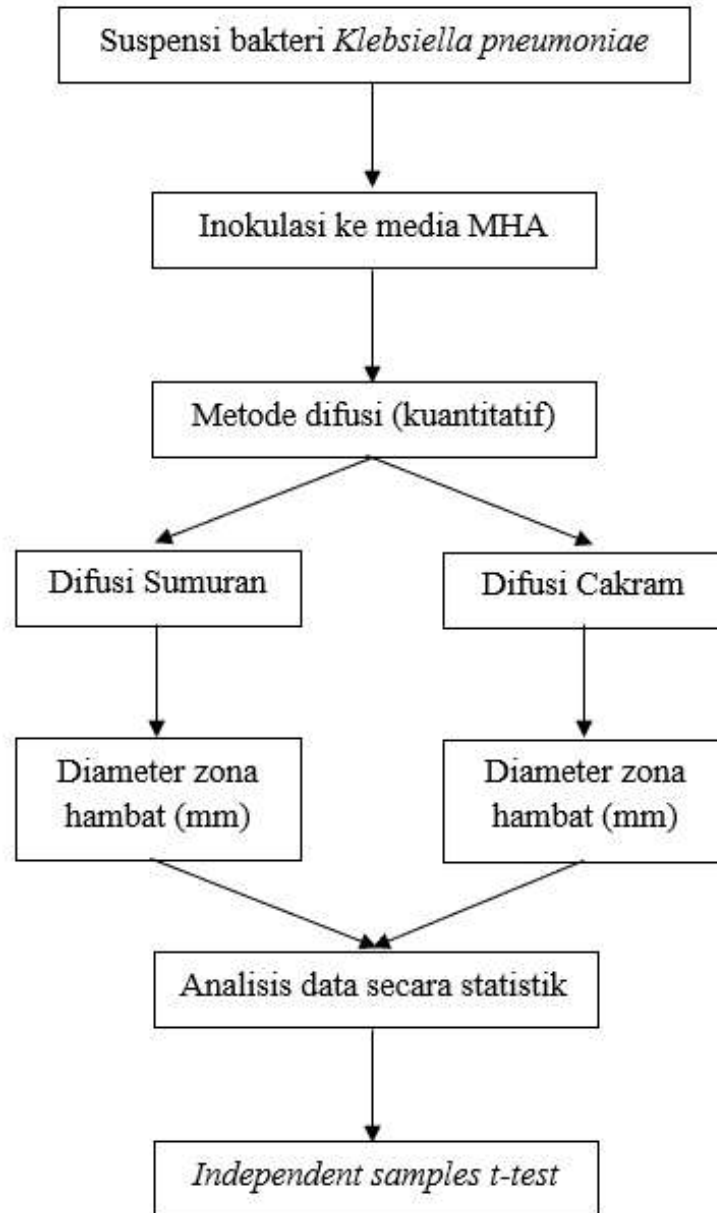
Dalam penelitian ini, dilakukan perlakuan atau intervensi pada sampel *Klebsiella pneumoniae* dengan menguji sensitivitasnya terhadap antibiotik kloramfenikol menggunakan metode difusi cakram dan difusi sumuran. Efek dari perlakuan tersebut diamati dalam bentuk zona hambat yang diukur menggunakan jangka sorong.

2. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *Posttest Only Control Group*, yang merupakan salah satu bentuk penelitian eksperimen murni yang melibatkan dua kelompok, yakni kelompok yang mendapat perlakuan atau kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan atau kelompok kontrol. Pengukuran variabel dependen hanya

dilakukan sekali setelah perlakuan (*posttest*) tanpa dilakukan pengukuran sebelum perlakuan (*pretest*), dengan randomisasi yang digunakan untuk memastikan bahwa kedua kelompok memiliki kesetaraan pada awal penelitian. Selanjutnya, hasil pengukuran kedua kelompok dibandingkan untuk mengevaluasi perubahan signifikan yang mungkin terjadi akibat perlakuan tersebut (Creswell & Creswell, 2018).

Dalam penelitian ini, kelompok kontrol adalah media tanpa antibiotik kloramfenikol, yaitu kontrol positif digunakan media yang berisikan *Klebsiella pneumoniae* dan kontrol negatif digunakan media kosong tanpa diberikan perlakuan. Kelompok eksperimen di antaranya adalah kelompok yang diberikan perlakuan metode difusi dengan teknik cakram dan sumuran. Setelah perlakuan, keseluruhan kelompok dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk untuk selanjutnya dianalisis serta dibandingkan secara statistik untuk melihat ada tidaknya perbedaan antara metode difusi sumuran dan cakram.

B. Alur Penelitian

Gambar 7. Alur Penelitian.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 yang didapatkan dari Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

2. Objek Penelitian

Objek yang menjadi fokus penelitian meliputi antibiotik kloramfenikol dan pengukuran diameter zona hambat.

3. Jumlah Sampel

Untuk meningkatkan keandalan hasil penelitian, diperlukan pengulangan yang memadai. Jumlah minimal pengulangan dihitung menggunakan rumus Ferderer.

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

Dengan:

t	= jumlah perlakuan
r	= jumlah pengulangan
15	= derajat kebebasan umum

Penelitian ini menerapkan dua jenis pengukuran, yaitu pengukuran zona hambat menggunakan metode difusi cakram dan metode difusi sumuran. Maka, jumlah minimal pengulangan (r) yang harus dilakukan adalah sebagai berikut.

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

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

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

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

$$r \geq 16$$

Berdasarkan hasil perhitungan, pengulangan minimum yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 16 kali. Dengan demikian, total data yang diperoleh dari kedua kelompok adalah sebanyak 32.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 28 April 2025 sampai dengan tanggal 1 Mei 2025.

2. Tempat Penelitian

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

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol yang diuji menggunakan metode difusi cakram dan metode difusi sumuran.

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

3. Variabel Pengganggu

- a. Kontaminan
- b. Ketebalan media
- c. Ketebalan suspensi bakteri
- d. Suhu
- e. Inkubasi

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel independen, yang juga dikenal sebagai variabel stimulus, prediktor, atau *antecedent*, dalam bahasa Indonesia sering disebut variabel bebas. Variabel ini berperan sebagai faktor yang mempengaruhi atau menyebabkan perubahan pada variabel dependen (variabel terikat) (Sugiyono, 2019). Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah antibiotik kloramfenikol yang diuji menggunakan dua metode, yaitu metode difusi cakram dan metode difusi sumuran.

a. Metode difusi cakram

Metode ini digunakan dalam uji antimikroba untuk mengukur diameter zona hambat dengan memanfaatkan cakram sebagai media

pemberian antibiotik. Satuan yang digunakan adalah satuan milimeter (mm) dengan skala rasio.

b. Metode difusi sumuran

Metode ini juga digunakan dalam uji antimikroba untuk menentukan diameter zona hambat, namun menggunakan lubang sumuran sebagai tempat pemberian antibiotik. Satuan yang digunakan adalah milimeter (mm) dengan skala rasio.

2. Variabel Terikat

Variabel dependen, yang juga dikenal sebagai variabel output, kriteria, atau konsekuen, dalam bahasa Indonesia sering disebut variabel terikat. Variabel ini merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi hasil dari perubahan yang terjadi pada variabel independen (Sugiyono, 2019). Diameter zona hambat merupakan variabel terikat dalam penelitian ini. Diameter zona hambat adalah area jernih yang terbentuk di sekitar cakram atau lubang sumuran akibat aktivitas antibiotik, yang diukur menggunakan alat jangka sorong. Satuan yang digunakan adalah milimeter (mm) dengan skala rasio.

3. Variabel Pengganggu

a. Kontaminan

Kontaminan adalah mikroorganisme, seperti bakteri atau jamur selain *Klebsiella pneumoniae*, yang dapat tumbuh pada media MHA dan memengaruhi hasil penelitian. Pengendalian dilakukan dengan sterilisasi alat dan bahan serta penerapan metode aseptis.

b. Ketebalan media

Ketebalan media MHA adalah ukuran tebal media yang digunakan untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Hal ini dikendalikan dengan memastikan volume media yang sama, yaitu 20 ml pada setiap cawan petri.

c. Kekeruhan suspensi bakteri

Kekeruhan suspensi bakteri merujuk pada tingkat kekeruhan yang dihasilkan saat bakteri diinokulasikan ke dalam NaCl fisiologis. Pengendalian dilakukan dengan membandingkan kekeruhan suspensi dengan standar McFarland.

d. Suhu inkubasi

Suhu inkubasi adalah derajat panas dalam inkubator. Pengendalian dilakukan dengan mengatur suhu sesuai ketentuan yang telah ditetapkan untuk mendukung pertumbuhan bakteri.

e. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi adalah durasi antara inokulasi hingga munculnya pertumbuhan koloni dengan karakteristik tertentu. Pengendalian dilakukan dengan memastikan waktu inkubasi sesuai aturan dan tidak melebihi durasi yang ditentukan.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer merupakan data yang dikumpulkan langsung oleh peneliti dari objek

penelitian (Sugiyono, 2017). Dalam penelitian ini, data diperoleh melalui pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan metode difusi cakram dan metode difusi sumuran.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| a. Cawan petri | k. Alat pelubang |
| b. Gelas ukur | l. Autoklaf |
| c. Neraca analitik | m. Lidi kapas steril |
| d. Batang pengaduk | n. Jangka sorong |
| e. Bunsen | o. Mikropipet |
| f. Tabung reaksi | p. Tip kuning |
| g. Ose bulat | q. Inkubator |
| h. Rak tabung | r. Tabung <i>screw cap</i> |
| i. Standar kekeruhan | s. Pinset |
| j. Kertas timbang | t. Sedotan <i>stainless steel</i> |

2. Bahan

- a. Isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae*
- b. Disk kloramfenikol
- c. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- d. NaCl fisiologis
- e. Akuades

I. Uji Validitas dan Reabilitas

Uji validitas dan reliabilitas instrumen penelitian dilakukan untuk memastikan data yang diperoleh bersifat valid dan reliabel. Menurut Saptutyningsih dan Setyaningrum (2019), validitas adalah tingkat ketepatan suatu alat ukur dalam mengukur objek yang dimaksud. Uji validitas digunakan untuk menilai seberapa baik sebuah tes atau instrumen mampu mengukur apa yang seharusnya diukur. Instrumen dikatakan valid jika mampu mengukur objek secara akurat dan tepat. Dalam pengujian validitas, setiap item diuji korelasinya terhadap skor total variabel terkait. Sebuah item dianggap valid jika memiliki koefisien korelasi (r) dengan skor total variabel minimal 0,25.

Saptutyningsih dan Setyaningrum (2019) menjelaskan bahwa reliabilitas merujuk pada konsistensi atau kestabilan hasil pengukuran yang dilakukan secara berulang dalam jangka waktu tertentu. Reliabilitas suatu alat ukur dapat dinilai dengan melakukan pengukuran ulang terhadap objek yang sama, dengan harapan mendapatkan hasil yang serupa. Untuk uji reliabilitas, biasanya digunakan nilai Alpha Cronbach. Jika nilai Alpha lebih dari 0,7, maka alat ukur dianggap memiliki reliabilitas yang memadai. Namun, nilai Alpha di bawah 0,5 menunjukkan reliabilitas rendah dan sebaiknya item tersebut tidak digunakan. Kriteria reliabilitas berdasarkan nilai Alpha adalah: nilai di atas 0,90 menunjukkan reliabilitas sempurna; antara 0,70 hingga 0,90 menunjukkan reliabilitas tinggi; antara 0,50 sampai 0,70 menunjukkan reliabilitas sedang; dan nilai di bawah 0,50 menunjukkan reliabilitas rendah.

Penelitian ini menggunakan jangka sorong sebagai alat untuk mengukur diameter zona hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae*, yang dinyatakan dalam satuan milimeter. Pengukuran dilakukan dengan mengukur zona jernih dari tepi atas hingga tepi bawah, melewati bagian tengah cakram atau sumuran. Pengulangan pengukuran dilakukan sebanyak 16 kali untuk masing-masing metode, yaitu metode difusi cakram dan metode sumuran.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Perizinan penggunaan Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sebagai tempat penelitian.
- b. Sterilisasi peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam pemeriksaan harus disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi dimulai dengan mencuci semua alat secara menyeluruh, kemudian mengeringkannya. Setelah itu, alat dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam oven untuk proses sterilisasi, yang dilakukan selama 24 jam pada suhu 100°C di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

- c. Sterilisasi akuades

Akuades ditempatkan dalam labu Erlenmeyer, lalu ditutup menggunakan kapas dan kertas. Kemudian, labu tersebut dilapisi dengan plastik dan diikat menggunakan tali rafia. Labu Erlenmeyer

yang berisi akuades selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk dilakukan proses sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C.

d. Pembuatan standar kekeruhan McFarland.

- 1) Dipersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Dibuat larutan BaCl₂ 1%, dengan cara dilarutkan serbuk BaCl₂ sebanyak 1 gram dalam 100 ml akuades.
- 3) Dibuat larutan H₂SO₄ 1%, dengan cara dilarutkan 1,04 ml asam sulfat dalam 100 ml akuades.
- 4) Dibuat standar kekeruhan McFarland dengan dicampurkan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1% dan 9,5 ml larutan BaCl₂ 1%.
- 5) Standar kekeruhan dimasukkan ke dalam tabung *screw up* dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

e. Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

- 1) Dipersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Diambil 1 ujung ose koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari media subkultur, kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis hingga kekeruhannya sesuai dengan standar McFarland.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji sensitivitas *Klebsiella pneumoniae* terhadap kloramfenikol metode difusi cakram.

- 1) Dicelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri yang telah distandarisasi kekeruhannya.

- 2) Ditunggu hingga suspensi terserap ke dalam kapas.
 - 3) Diangkat lidi kapas dan ditekankan pada dinding bagian dalam tabung.
 - 4) Digoreskan suspensi pada lidi kapas ke media MHA hingga menutupi seluruh permukaan media. Diulangi hingga sebanyak tiga kali goresan dan dengan permukaan lidi kapas yang berbeda.
 - 5) Dibiarkan media MHA di atas meja selama 5-15 menit sehingga suspensi dapat meresap ke dalam media.
 - 6) Ditempelkan dan ditekan cakram antibiotik kloramfenikol pada media MHA dengan menggunakan pinset.
 - 7) Ditutup cawan petri secara rapat, kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas dan plastik.
 - 8) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.
- b. Uji sensitivitas *Klebsiella pneumoniae* terhadap kloramfenikol metode difusi sumuran.
- 1) Dicelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri yang telah distandarisasi kekeruhannya.
 - 2) Ditunggu hingga suspensi terserap ke dalam kapas.
 - 3) Diangkat lidi kapas dan ditekankan pada dinding bagian dalam tabung.
 - 4) Digoreskan suspensi pada lidi kapas ke media MHA hingga menutupi seluruh permukaan media. Diulangi hingga sebanyak tiga kali goresan dan dengan permukaan lidi kapas yang berbeda.

- 5) Dibiarkan media MHA di atas meja selama 5-15 menit sehingga suspensi dapat meresap ke dalam media.
- 6) Dibuat lubang sumuran pada media MHA dengan menggunakan sedotan *stainless steel* sebagai alternatif borer steril.
- 7) Dimasukkan larutan kloramfenikol pada masing-masing lubang sumuran.
- 8) Ditutup cawan petri secara rapat, kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas dan plastik.
- 9) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

3. Tahap Pengamatan

a. Pengamatan metode cakram

- 1) Cawan petri dikeluarkan dari incubator.
- 2) Dilakukan pengamatan hasil dan diukur diameter zona hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.
- 3) Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih di sekitar disk, yaitu tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Hasilnya dicatat dengan satuan milimeter (mm).

b. Pengamatan metode sumuran

- 1) Cawan petri dikeluarkan dari incubator.
- 2) Dilakukan pengamatan hasil dan diukur diameter zona hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan menggunakan jangka sorong dengan latar belakang terang.

- 3) Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih di sekitar disk, yaitu tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Hasilnya dicatat dengan satuan milimeter (mm).

K. Manajemen Data

Data yang terkumpul dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan pendekatan deskriptif, analitik, dan statistik. Analisis deskriptif dilakukan untuk menyajikan data secara keseluruhan dalam bentuk tabel, sementara analisis statistik bertujuan untuk menggeneralisasi hasil dari sampel ke populasi.

1. Penyajian Data

Pengolahan data merupakan langkah krusial untuk memperoleh jawaban terhadap pertanyaan penelitian, yang kemudian akan memberikan interpretasi yang lebih bermakna. Pengolahan data akan dilakukan setelah seluruh data terkumpul dan disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh akan disajikan dalam diagram batang dan dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan hasil pengukuran diameter zona hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan metode difusi cakram dan sumuran. Analisis ini dilakukan terhadap keseluruhan data yang terkumpul.

3. Analisis Analitik

Analisis analitik dilakukan dengan membandingkan data diameter zona hambat yang dihasilkan dari metode difusi cakram dan sumuran dengan tabel standar, untuk mengetahui tingkat kekuatan antibiotik yang digunakan.

4. Analisis Statistik

Analisis statistik akan dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows. Pengujian statistik akan dilakukan dengan menggunakan uji *Independent T-test* atau *Mann-Whitney*, tergantung pada distribusi data. Uji *Independent T-test* diterapkan jika data berdistribusi normal dan homogen, sedangkan uji *Mann-Whitney* digunakan jika salah satu atau kedua syarat tersebut tidak terpenuhi.

a. Uji normalitas data

Data yang diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat seluruh kelompok akan dimasukkan ke dalam program SPSS 16.0. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*, karena jumlah data kurang dari 50. Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Hipotesis nol (H_0) diterima jika $\text{asympt.sig} > 0,05$ dan hipotesis alternatif (H_a) ditolak, sedangkan H_a diterima jika $\text{asympt.sig} \leq 0,05$.

H_0 : Data berdistribusi normal

H_a : Data tidak berdistribusi normal

b. Uji homogenitas data

Uji homogenitas digunakan untuk menguji kesamaan varians antar kelompok. Hipotesis nol diterima jika $\text{asympt.sig} > 0,05$ dan ditolak jika $\text{asympt.sig} \leq 0,05$.

H_0 : Data homogen

H_a : Data tidak homogen

c. Uji *Independent Samples T-Test*

Uji ini dilakukan jika data berdistribusi normal dan homogen, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara zona hambat yang dihasilkan dari metode difusi cakram dan sumuran. Hipotesis nol diterima jika $\text{asympt.sig} > 0,05$, dan ditolak jika $\text{asympt.sig} < 0,05$.

H_0 : Tidak ada perbedaan

H_a : Ada perbedaan

d. Uji *Mann-Whitney*

Uji *Mann-Whitney* digunakan apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, untuk mengetahui adanya perbedaan zona hambat yang dihasilkan oleh kedua metode. Hipotesis nol diterima jika $\text{asympt.sig} > 0,05$, dan ditolak jika $\text{asympt.sig} \leq 0,05$.

H_0 : Tidak ada perbedaan

H_a : Ada perbedaan

L. Etika Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa risiko bagi peneliti, namun risiko-risiko tersebut dapat diminimalisir dengan penggunaan alat pelindung diri (APD). APD yang digunakan dalam penelitian ini meliputi jas laboratorium, sarung tangan, sepatu tertutup, dan masker wajah, yang bertujuan untuk melindungi peneliti dari paparan bahan berbahaya serta mencegah kontaminasi bakteri. Penelitian ini juga telah memperoleh persetujuan etik **No.DP.04.03/e-KEPK.1/649/2025** dari Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Persetujuan tersebut diberikan setelah peneliti mengirimkan berkas dan proposal penelitian kepada komisi etik.