

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1) Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan pendekatan penelitian *True Experiment*. Jenis penelitian ini dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2013). Pada penelitian ini dibutuhkan dua kelompok yakni kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Dalam penelitian ini dilakukan pembuatan media modifikasi *MacConkey Agar* (MCA) dengan mengganti indikator *neutral red* menjadi *phenol red*. Indikator *neutral red* digunakan sebagai kelompok kontrol, sedangkan indikator *phenol red* digunakan sebagai kelompok eksperimen untuk dibandingkan hasilnya terhadap kelompok kontrol.

2) Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan *Posttest Only Control Design*. Desain penelitian ini menggunakan dua kelompok sampel pada setiap kelompok sampel ditentukan melalui proses randomisasi tanpa adanya pengukuran awal dan hanya dilakukan pengukuran akhir. Dalam penelitian ini, data kelompok eksperimen diperoleh dari hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Escherichia coli* pada media modifikasi MCA dengan indikator *phenol red*. Kelompok kontrol adalah hasil pengukuran diameter

koloni bakteri *Escherichia coli* yang ditanam pada media MCA standar.

Desain penelitian ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Desain Penelitian

Sampel	Perlakuan	Posttest
R (Kelompok Eksperimen)	X	O1
R (Kelompok Kontrol)	Y	O2

Keterangan:

R : Randomisasi sampel

X : Media modifikasi MCA indikator *phenol red*

Y : Media MCA standar indikator neutral red

O1 : Hasil pengukuran diameter koloni pada media modifikasi MCA indikator *phenol red*.

O2 : Hasil pengukuran diameter koloni pada media MCA standar Indikator *neutral red*.

Pengulangan pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus

Federer:

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

t : jumlah kelompok perlakuan

r : jumlah pengulangan yang dilakukan

Jumlah pengulangan pada penelitian ini diperoleh berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus federer di atas, sebagai berikut:

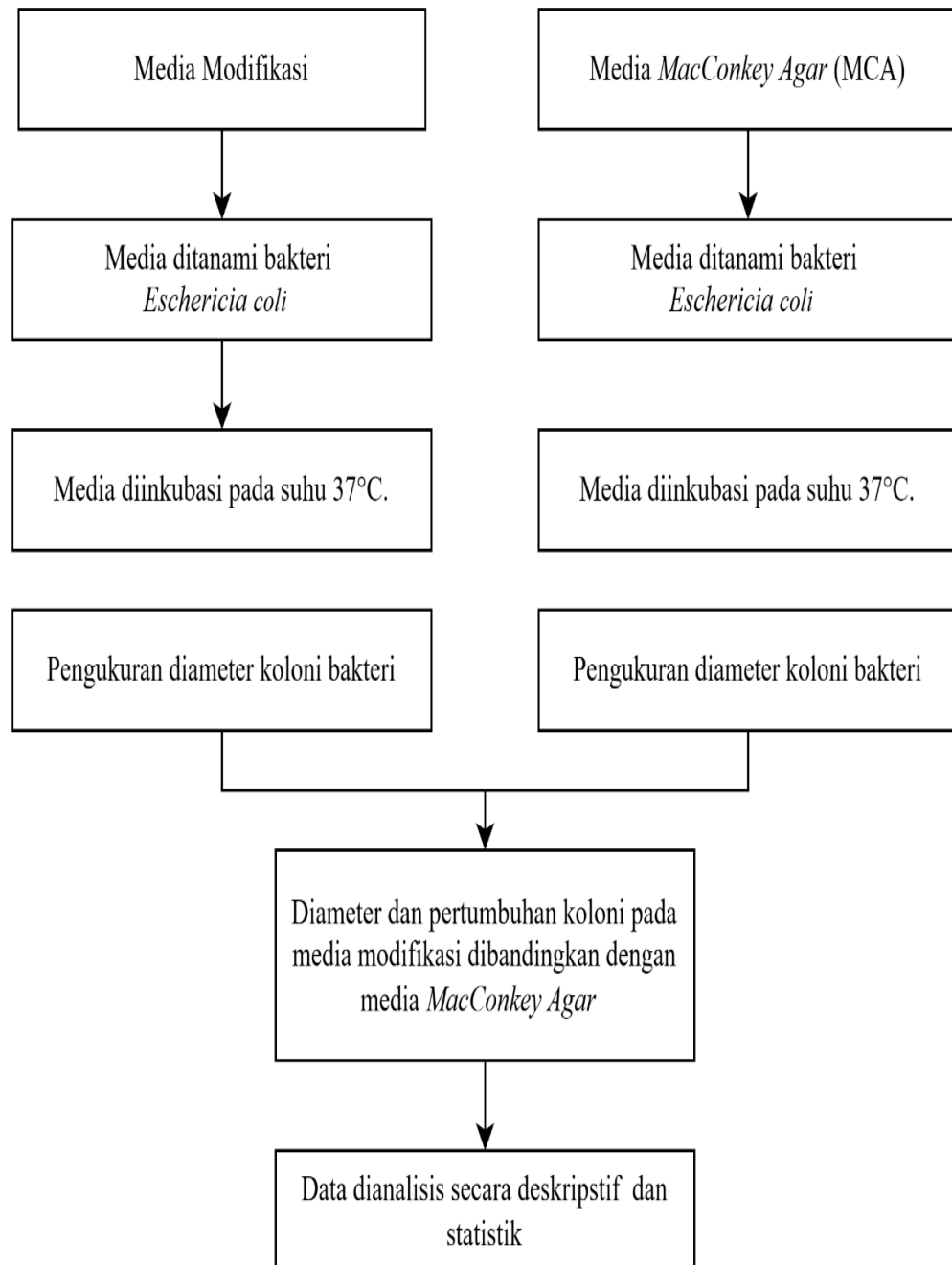
$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 16$$

Berdasarkan hasil tersebut, jumlah pengulangan minimal yang dilakukan sebanyak 16 kali. Penelitian ini menggunakan 16 kali pengulangan pada media modifikasi MCA dan standar, sehingga diperoleh total 32 data.

B. Rancangan Penelitian

Gambar 6. Rancangan Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Dinas Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Objek

Objek dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media modifikasi dan MCA standar

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2026.

2. Tempat Penelitian

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

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian adalah media modifikasi *MacConkey Agar* (MCA).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* pada media modifikasi dan MCA standar.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu inkubasi, waktu inkubasi, biakkan murni bakteri, teknik penanaman dan kontaminan.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

- a. Media Modifikasi *MacConkey Agar* (MCA) media yang disusun dari komponen dasar MacConkey Agar dengan substitusi indikator *neutral red* menggunakan phenol red.

2. Variabel Terikat

- a. Hasil pertumbuhan *Escherichia coli* adalah koloni yang tumbuh pada media modifikasi yang diamati karakteristik morfologi koloni dan sel bakteri. Diameter diukur pada 3 koloni terpisah pada cawan petri menggunakan jangka sorong digital kemudian dihitung rata-ratanya dalam satuan milimeter (mm), menggunakan skala rasio.

3. Variabel Kontrol

- a. Suhu inkubasi adalah temperatur yang perlu diperhatikan untuk menumbuhkan bakteri. Pengendalian dilakukan dengan melakukan inkubasi media agar menggunakan inkubator pada suhu 37°C.
- b. Waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan bakteri untuk tumbuh pada media agar. Pengendalian dilakukan dengan melakukan pengamatan 24 jam setelah penanaman bakteri.

- c. Kemurniaan biakan bakteri adalah di mana kultur bakteri yang digunakan dalam penelitian hanya terdiri dari satu jenis bakteri tanpa kontaminasi oleh mikroorganisme lain. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biakan murni *Escherichia coli*.
- d. Teknik penanaman dan suspensi bakteri adalah prosedur laboratorium untuk menanam bakteri pada media kultur secara aseptik dan menyiapkan suspensi bakteri dengan konsentrasi tertentu berdasarkan standar kekeruhan *McFarland*. Penanaman dilakukan menggunakan *streak plate*, untuk mendapatkan koloni yang terpisah dan mudah diamati.
- e. Kontaminan adalah mikroorganisme seperti bakteri atau jamur selain bakteri *Escherichia coli* yang dapat tumbuh pada media pertumbuhan. Kontaminan dapat dikendalikan dengan cara sterilisasi alat dan bahan serta berlaku aseptis saat bekerja.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer yang merupakan hasil penelitian nyata yang dilakukan oleh peneliti. Data primer merupakan data asli yang dikumpulkan oleh peneliti secara langsung (Sugiyono, 2019). Teknik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mengumpulkan data dari hasil percobaan di laboratorium berupa hasil pengukuran pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* yang diukur diameter koloninya pada media modifikasi MCA.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat

- | | |
|--------------------|--------------------|
| a. Neraca analitik | i. Corong |
| b. Autoclave | j. Mikropipet |
| c. Inkubator | k. Spritus |
| d. Labu erlenmeyer | l. Korek api |
| e. Tabung reaksi | m. Jangka sorong |
| f. Cawan petri | n. Oven |
| g. Gelas ukur | o. Batang pengaduk |
| h. Ose steril | |

2. Bahan

a. Bubuk Media MCA per 1/liter

- | | |
|-----------------------|---------|
| 1) Peptone | 20 gram |
| 2) NaCl | 5 gram |
| 3) Laktosa | 10 gram |
| 4) Agar | 12 gram |
| 5) Garam empedu | 5 gr |
| 6) <i>Neutral red</i> | 0.075gr |

b. Bubuk Media Modifikasi per 400/ml

- | | |
|------------------|-----------|
| 1) Nutrient Agar | 11.2 gram |
| 2) Laktosa | 4 gram |
| 3) Garam empedu | 2 gram |

- 4) NaCl 1 gram
- 5) *Phenol red* 0,03 gram
- c. Suspensi bakteri *Escherichia coli*
- d. NaCl 0,85%
- e. Aquades

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas dan reliabilitas instrumen perlu dilaksanakan untuk memastikan bahwa hasil penelitian valid. Instrumen yang valid merupakan alat ukur yang difungsikan untuk mengukur parameter yang relevan. Instrumen valid adalah proses untuk mengukur sejauh mana suatu instrumen pengukuran mampu mengukur variabel yang hendak diukur dengan akurat (Sugiyono, 2019). Sedangkan instrumen reliabel adalah alat ukur yang digunakan untuk mengukur ketepatan suatu instrumen pengukuran dalam mengukur variabel yang sama pada waktu yang berbeda atau pada sampel yang berbeda (Sugiyono, 2019).

Penelitian ini mengukur diameter koloni bakteri menggunakan jangka sorong digital dan dinyatakan dalam skala satuan milimeter. Pengulangan pada masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 16 kali. Pengambilan data dilakukan langsung oleh peneliti dengan diawasi oleh PLP Bakteriologi untuk memastikan prosedur sesuai standar.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Kaji Etik

Kaji etik telah dilakukan untuk dapat melaksanakan penelitian di lingkungan Politeknik Kesehatan Kemenkes Yogyakarta.

b. Perizinan

Perizinan telah dilakukan untuk dapat melaksanakan penelitian di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

c. Sterilisasi alat

Alat dicuci kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 110°C selama 8 jam.

d. Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

- 1) Disiapkan alat dan bahan.
- 2) Diambil biakkan bakteri koloni *E. coli* dengan ose secara aseptis.
- 3) Kultur diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* miring steril dengan metode zig-zag secara aseptis di dekat api.
- 4) Media *Nutrient Agar* diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-24 jam.

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Diambil koloni bakteri *E. coli* hasil subkultur secara aseptis.
- 3) Dimasukkan koloni ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,85% steril.

- 4) Disesuaikan kekeruhan suspensi bakteri *E. coli* disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 dengan alat densitometer.
- 5) Suspensi *E. coli* siap digunakan.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Pembuatan Media Standar MCA

- 1) Ditimbang bubuk MCA sebanyak 20,8 gram menggunakan timbangan analitik.
- 2) Dimasukkan bubuk MCA ke dalam labu Erlenmeyer ditambah 400 ml aquades dan dihomogenkan.
- 3) Diukur pH, jika pH media awal lebih tinggi dari 7,1 tambahkan larutan HCl sedikit demi sedikit. Jika pH media awal lebih rendah 7,1 ditambahkan larutan NaOH sedikit demi sedikit.
- 4) Ditutup labu Erlenmeyer dengan kapas dan plastik, kemudian diikat dengan tali rafia.
- 5) Disterilkan media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- 6) Dituang media ke dalam cawan petri steril secara aseptis.

b. Pembuatan Media Modifikasi MCA

- 1) Ditimbang bubuk NA 11,2 gram, laktosa 4 gram, garam empedu 2 gram, NaCl 1 gram, dan *phenol red* 0,03 gram
- 2) Dimasukkan bubuk ke dalam labu Erlenmeyer ditambah 400 ml aquades dan dihomogenkan.

- 3) Diukur pH, jika pH media awal lebih tinggi dari 7,1 tambahkan larutan HCl sedikit demi sedikit. Jika pH media awal lebih rendah 7,1 ditambahkan larutan NaOH sedikit demi sedikit.
- 4) Ditutup labu Erlenmeyer dengan kapas dan plastik, kemudian diikat dengan tali rafia.
- 5) Disterilkan media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- 6) Dituang media ke dalam cawan petri steril secara aseptis.

c. Inokulasi Bakteri Media Modifikasi dan Media Standar

- 1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Diletakkan media agar mencapai suhu kamar.
- 3) Diinokulasi suspensi bakteri yang telah diencerkan pada media modifikasi MCA dan MCA standar menggunakan teknik *streak plate*.
- 4) Diinkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Tahap Pengamatan

a. Pengamatan karakteristik morfologi koloni bakteri

- 1) Diambil media MCA modifikasi dan standar dari inkubator.
- 2) Diamati morfologi koloni bakteri secara makroskopis, meliputi warna, ukuran, tepian, konsistensi, elevasi, dan permukaan.

b. Pengamatan karakteristik sel bakteri

- 1) Diambil media MCA modifikasi dan standar dari inkubator

- 2) Dilakukan pewarnaan Gram untuk mengamati karakteristik sel bakteri *E. coli* yang tumbuh secara mikroskopis, meliputi hasil Gram, bentuk, dan formasi bakteri.
- c. Pengukuran diameter koloni bakteri
 - 1) Diambil media MCA modifikasi dan standar dari inkubator.
 - 2) Dipilih koloni tunggal pada cawan petri dan diukur menggunakan jangka sorong digital.
4. Tahap pengumpulan data
 - a. Melakukan pengumpulan data karakteristik morfologi dan sel bakteri disajikan dalam bentuk narasi deskriptif.
 - b. Melakukan pencatatan pengukuran diameter koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada MCA modifikasi dan standar dari inkubator.

K. Manajemen Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa data primer, yaitu data yang langsung memberi informasi kepada peneliti (Sugiyono, 2019). Pada penelitian ini, data yang terkumpul dianalisis menggunakan analisis deskriptif, analitik dan statistik. Analisis deskriptif dilakukan untuk menggambarkan hasil pengamatan pertumbuhan bakteri. Analisis analitik meliputi perhitungan efektivitas media modifikasi dan analisis statistik digunakan untuk menggeneralisasikan data sampel terhadap populasi.

1. Analisis deskriptif

Data yang diperoleh kemudian dianalisis deskriptif untuk menggambarkan hasil pengamatan morfologi koloni dan karakteristik sel

bakteri *E. coli* pada media modifikasi dengan indikator *phenol red* dan media standar MCA. Kemudian data diameter koloni disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan rata-rata pertumbuhan bakteri *E. coli* pada media modifikasi MCA.

2. Analisa analitik

Data yang diperoleh merupakan hasil pengukuran diameter koloni bakteri pada media modifikasi dengan indikator *phenol red* dan media standar MCA. Diameter koloni digunakan sebagai parameter untuk kemampuan media mendukung pertumbuhan bakteri. Data yang diperoleh akan dihitung nilai rerata, selisih rerata dan persentase efektivitas dan dilakukan interpretasi tingkat efektivitas dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Efektivitas} = \frac{\text{Rerata hasil diameter pertumbuhan bakteri pada media modifikasi}}{\text{Rerata hasil diameter pertumbuhan bakteri pada media standar}} \times 100\%$$

Hasil persentase kemudian dibandingkan dengan kriteria tingkat efektivitas sesuai pada tabel 4.

Tabel 4. Kriteria Tingkat Efektivitas

Persentase	Kriteria Efektivitas
> 100%	Sangat Efektif
90-100%	Efektif
80-90%	Cukup Efektif
60-80%	Kurang Efektif
< 60%	Tidak Efektif

Sumber: Yulindawati, 2018.

3. Analisis statistik

Diameter koloni bakteri pada media diukur pada media modifikasi indikator *phenol red* dan media standar *MacConkey Agar* (MCA) yang nantinya dilakukan uji statistik meliputi normalitas menggunakan software

SPSS ver. 25 untuk mengetahui sebaran data. Uji normalitas data dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk* dikarenakan data yang digunakan ≤ 50 . Uji ini bertujuan untuk memastikan data berdistribusi normal atau tidak berdistribusi normal. H_0 diterima apabila nilai $Sig \geq 0,05$ dan H_0 ditolak apabila nilai $Sig < 0,05$.

Data kemudian di uji homogenitas untuk memastikan apakah data homogen atau tidak setelah data dinyatakan berdistribusi normal. H_0 diterima apabila nilai $Sig \geq 0,05$ dan data dinyatakan homogen. Data yang homogen dilanjutkan dengan uji *Independent Samples T-Test* untuk membandingkan rata-rata dari dua populasi yang datanya berskala rasio. Sedangkan data yang berdistribusi tidak normal dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U (2 Independent Samples)*.

L. Etika Penelitian

Peneliti telah memperoleh persetujuan etik dari komite etik penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan Nomor Registrasi No.DP.04.03/e-KEPK.1/1344/2025. Pembebasan ini berlaku sejak 31 Desember 2025 sampai 31 Desember 2026.