

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan pendekatan kuantitatif dengan metode eksperimen. Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experiment* dengan desain *posttest-only control group*. Pada desain ini pengukuran hasil (*post-test*) dilakukan pada kedua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Namun hanya kelompok eksperimen yang diberikan perlakuan tertentu untuk mengamati perbedaan hasil antara kedua kelompok tersebut (Cresswell, 2016). Dalam penelitian ini kelompok eksperimen (bakteri *Staphylococcus aureus* yang di isolasi dengan metode perebusan) diberi perlakuan dengan memberi tambahan tahap presipitasi etanol. Berikut merupakan bentuk desain pada penelitian ini:

Tabel 2.

Desain Penelitian *Posttest-Only Control Group Design*

Kelompok	Perlakuan	Post-test
Kontrol (Tanpa Perlakuan)	-	O1
Perlakuan (Intervensi)	X	O2

Keterangan :

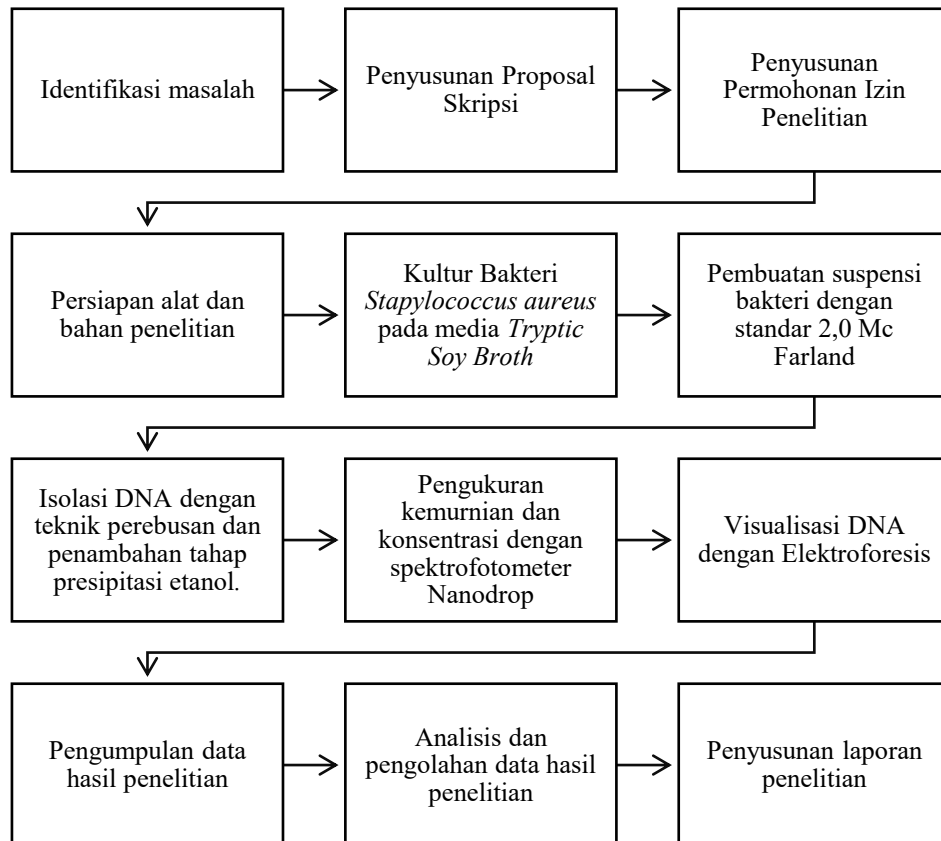
O1 : Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA *Staphylococcus aureus* pada pada kelompok kontrol.

X : Pemberian perlakuan dengan penambahan tahap presipitasi etanol

O2 : Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan.

- : Tidak ada perlakuan yang diberikan kepada kelompok kontrol

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu bagian Biologi Sel dan Molekuler Poltekkes Kemenkes Denpasar dengan kegiatan pengujian berupa isolasi DNA *Staphylococcus aureus* menggunakan metode perebusan serta visualisasi DNA dengan Elektroforesis. Kemudian penelitian dilanjutkan di

Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Warmadewa dengan kegiatan analisis kemurnian dan konsentrasi hasil isolate DNA *Staphylococcus aureus* dengan Spektrofotometer Nanodrop.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Oktober 2024 sampai dengan Juni 2025.

D. Sampel dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel homogen yaitu koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang berhasil tumbuh dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan kondisi baik.

2. Unit analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini yakni tingkat kemurnian dan konsentrasi hasil isolat DNA *Staphylococcus aureus* menggunakan metode perebusan tanpa penambahan tahap presipitasi etanol dan dengan penambahan tahap presipitasi etanol.

3. Jumlah dan besar sampel

a. Ukuran

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Federer. Rumus ini memberikan cara yang sederhana untuk menghitung jumlah sampel yang diperlukan untuk mendeteksi perbedaan signifikan antar perlakuan dengan perhitungan sebagai berikut (Federer, 1955):

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

Keterangan:

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 2 kelompok perlakuan terdiri dari:

- a. Kelompok I : Bakteri suspensi 2,0 mcFarland tanpa tahap presipitasi etanol
- b. Kelompok II : Bakteri suspensi 2,0 mcFarland + tahap presipitasi etanol

Sehingga dengan rumus Federer, perhitungan yang dilakukan yaitu:

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

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

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

$$n \geq 15+1$$

$$n \geq 16$$

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus Federer, didapatkan jumlah minimal sampel per kelompok adalah 16 sampel. Pada penelitian ini menggunakan 17 sampel dimana 1 sampel untuk kontrol negatif pada tiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah seluruh sampel penelitian sebanyak 34 sampel.

b. Kriteria inklusi

- 1) Bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh dalam kondisi baik dengan suhu dan lingkungan penyimpanan yang sesuai.
- 2) Adanya kekeruhan yang merata pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB)

c. Kriteria eksklusi

- 1) Media pertumbuhan *Tryptic Soy Broth* mengalami degradasi atau rusak.
- 2) Adanya pertumbuhan jamur, mikroorganisme serta kontaminan lain pada media *Tryptic Soy Broth*.

4. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang diterapkan dalam penelitian ini adalah menggunakan metode *simple random sampling*. Pemilihan teknik ini dilakukan mengingat populasi bakteri *Staphylococcus aureus* hasil kultur di laboratorium tersedia dalam jumlah besar serta merupakan sampel murni yang homogen (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

E. Prosedur Kerja

1. Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Alat

- 1) Ose
- 2) Autoclaf
- 3) Magnetic Stirrer
- 4) Neraca Analitik
- 5) Bio Safety Cabinet Level II
- 6) Inkubator
- 7) Rak Tabung Reaksi
- 8) Tabung Reaksi Steril
- 9) Erlenmeyer

b. Bahan

- 1) 15 gram Bubuk *Tryptic Soy Broth*
- 2) 1 liter Aquadest
- 3) Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

c. Prosedur Kerja

- 1) Sebanyak 15 gram bubuk *Tryptic Soy Broth* dilarutkan dengan 500 ml akuades dalam Erlenmeyer, kemudian diaduk menggunakan magnetic stirrer.
- 2) Setelah itu, medium *Tryptic Soy Broth* disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 3) Setelah media mendingin hingga suhu ruang, tambahkan inokulum *Staphylococcus aureus* (biasanya dari koloni yang sudah tumbuh pada agar miring atau pelat agar) sebanyak 1 ml ke dalam tabung yang berisi *Tryptic Soy Broth* steril. Gunakan ose yang telah disterilkan untuk memindahkan koloni bakteri ke dalam media cair.
- 4) Selanjutnya, medium *Tryptic Soy Broth* yang telah berisi koloni *Staphylococcus aureus* diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- 5) Setelah inkubasi, pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dapat diamati dengan adanya kekeruhan (turbiditas) di media cair. Semakin keruh media, semakin banyak bakteri yang tumbuh. Jika diperlukan, bakteri dapat dipanen dengan sentrifugasi untuk digunakan dalam eksperimen lebih lanjut atau untuk penyimpanan

2. Isolasi DNA Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Alat

- 1) Mikropipet
- 2) Waterbath
- 3) Freezer -80°C
- 4) Bio Safety Cabinet level II

- 5) Rak microtube
- 6) Centrifuge tube 50 ml
- 7) Microcentrifuge
- 8) Vortex
- 9) Densitometer Mc Farland

b. Bahan

- 1) Aquadest steril
- 2) Koloni Bakteri *Staphylococcus aureus*
- 3) Etanol 100%
- 4) Larutan TE Buffer

c. Prosedur Kerja

- 1) Menyiapkan aquadest steril atau NaCl steril di tabung reaksi dengan volume $\pm$ 10 ml.
- 2) Membuat suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sesuai dengan standar 2,0 Mc Farland dengan cara larutan uji ditambahkan pelet bakteri kemudian di vortex dan diukur dengan densitometer hingga mencapai kekeruhan yang diinginkan.
- 3) Selanjutnya pindahkan hasil suspensi kedalam beberapa tabung mikrotube dengan volume yang sama sebanyak 1 ml
- 4) Kemudian tabung di centrifuge dalam microsentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit
- 5) Sentrifugasi akan menghasilkan pelet dan supernatan. Lalu buang supernatant dan sisakan pelet
- 6) Masukkan larutan TE buffer sebanyak 100 ul ke masing-masing tabung

- 7) Kemudian homogenkan dengan vortex selama kurang lebih 1 menit
- 8) Lalu lakukan perebusan dalam waterbath berisi aquadest dengan suhu 100 °C selama 5 menit
- 9) Setelah itu, biarkan isolate dalam suhu ruang lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit
- 10) Pindahkan supernatant ke tabung mikrotube yang baru.
- 11) Lalu tambahkan 700 ul alkohol 96% lalu diinkubasi selama 5 menit pada freezer dengan suhu -80°C sambil dibolak balikkan.
- 12) Kemudian, sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit
- 13) Buang supernatant, lalu tambahkan 500 ul alkohol 70%
- 14) Selanjutnya, sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit
- 15) Hilangkan supernatant lalu keringkan pellet DNA selama 10 menit, Setelah kering, tambahkan 50 ul TE (Tris-EDTA) kemudian homogenkan
- 16) Proses isolasi selesai, isolat DNA dapat disimpan pada lemari pendingin dengan suhu -20 °C apabila belum dilanjutkan ke tahap penelitian selanjutnya.

3. Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Alat

- 1) Spektrofotometer Nanodrop
- 2) Mikropipet
- 3) Tip
- 4) Tissue

b. Bahan

- 1) DDH₂O
- 2) Isolat DNA *Staphylococcus aureus*

c. Prosedur Kerja

- 1) Alat nanodrop dihidupkan dan disambungkan ke komputer.
- 2) Kemudian, DDH₂O sebanyak 2 µl diambil untuk digunakan sebagai blanko dalam pengukuran sampel. Setelah blanko menunjukkan nilai 0 ng, pengukuran konsentrasi sampel DNA dilakukan.
- 3) Sampel DNA sebanyak 2 µl diambil dan diletakkan di tempat pembacaan, kemudian alat ditutup dan tekan tombol enter pada komputer yang mengoperasikan program Nanodrop untuk memulai pembacaan. Konsentrasi DNA dapat dilihat pada layar komputer (Fauziah, 2020).

4. ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

a. Alat

- 1) Tabung Eppendorf
- 2) Tabung PCR
- 3) Mikropipet + tip
- 4) Microcentrifuge
- 5) Spindown
- 6) Laminator Flow
- 7) Termal Cycler Biometra Tatnanmanced

b. Bahan

- 1) Taq 2x Master Mix
- 2) Primer forward
- 3) Primer reverse
- 4) PCR Grade H₂O
- 5) DNA Template

c. Prosedur Kerja

- 1) Langkah awal dalam PCR adalah dengan membuat PCR Mix dengan mencampurkan reagen sebagai berikut:

Tabel 3.

PCR Mix

Reagen	Volume (1x)	Volume (34x)	Konsentrasi Akhir
Taq 2x Master Mix	12,5 µl	425 µl	1x
10 µM primer <i>forward</i>	0,5 µl	17 µl	0,1 µM
10 µM primer <i>reverse</i>	0,5 µl	17 µl	0,1 µM
Template	4 µl	4 µl	-
PCR Grade H ₂ O	7,5 µl	255 µl	-
Total	25 µl	850 µl	-

- 2) Pastikan reagen tercampur secara merata dengan melakukan homogenisasi. Setelah itu, lakukan spindown selama beberapa detik untuk memastikan cairan yang menempel pada tutup dan dinding tabung eppendorf turun ke bagian bawah tabung.
- 3) Proses selanjutnya adalah tahap PCR menggunakan thermal cycler. Pertama, alat diatur dengan menambahkan langkah-langkah PCR sebagai berikut: suhu 95°C selama 4 menit untuk aktivasi enzim polimerase; kemudian, suhu 95°C selama 30 detik untuk proses denaturasi; dilanjutkan dengan suhu 60°C selama 30 detik untuk tahap annealing, di mana primer menempel pada template DNA; setelah itu, suhu 72°C selama 30 detik untuk tahap ekstensi, di mana DNA baru disintesis. Seluruh siklus ini diulang sebanyak 40 kali. Setelah siklus selesai, suhu diatur pada 72°C selama 5 menit untuk ekstensi akhir, dan terakhir, suhu

diatur pada 4°C tanpa batas waktu untuk menjaga stabilitas hasil PCR sebelum tahap berikutnya.

- 4) Selanjutnya letakkan sampel yang akan di running sesuai dengan setting plate yang telah dibuat sebelumnya, tunggu running selesai.

5. Uji Visualisasi DNA Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Alat

- 1) Gelas ukur
- 2) Erlenmeyer
- 3) Mikropipet + tip
- 4) Magnetic stirrer
- 5) Hotplate
- 6) Timbangan analitik
- 7) Batang pengaduk
- 8) Cetakan gel (gel tray)
- 9) Sisir/sumuran/comb
- 10) Satu set alat elektroforesis
- 11) UV Documentation

b. Bahan

- 1) Buffer TAE
- 2) Bubuk Agarose
- 3) Gel stain (florosafe DNA)
- 4) Aquadest
- 5) Loading dye

c. Prosedur Kerja

- 1) Lakukan proses pengenceran buffer TAE dengan mencampurkan 20 ml buffer TAE stock dengan 980 ml aquadest.
- 2) Lakukan pembuatan gel agarose dengan menimbang 2,25 gram bubuk agarose ditambah dengan 150 ml hasil pengenceran buffer TAE, lalu dihomogenkan dan dipanaskan diatas hotplate dengan magnetic stirrer.
- 3) Setelah bubuk agarose larut, diamkan gel hingga mencapai suhu hangat (55-60°C) lalu tambahkan pewarna atau stain (florosafe) sebanyak 6µl dan homogenkan kembali
- 4) Selanjutnya, tuang gel kedalam cetakan (gel tray) yang sudah di rekatkan serta ditambahkan pencetak sumuran atau sisir atau comb. Tunggu hingga gel mengeras dan lepaskan comb dari cetakan.
- 5) Letakkan gel di sumuran elektroforesis, tambahkan buffer TAE sampai menutupi seluruh permukaan gel.
- 6) Homogenkan 5 ul sampel + 1 ul loading dye lalu injeksikan ke dalam well/sumuran gel agarose, lakukan proses berulang untuk semua sampel.
- 7) Setelah itu, programkan alat elektroforesis selama 60 menit pada 77 voltase dan 200 Am
- 8) Setelah running selesai, lakukan pembacaan gel di UV Documentation untuk melihat pendaran band/pita DNA

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Penelitian ini menggunakan data primer yang didapatkan dengan melakukan pemeriksaan laboratorium. Data primer diperoleh dari data hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi isolat DNA *Staphylococcus aureus* dengan spektrofotometer Nanodrop dan pendaran pita DNA di gel Elektroforesis.

b. Data sekunder

Data sekunder pada penelitian ini terdiri dari berbagai jenis informasi yang telah dicatat dan dipublikasikan dalam studi literatur dari beberapa sumber, termasuk artikel dan buku terkait.

2. Teknik pengumpulan data

Pada penelitian ini data dikumpulkan dengan cara observasi, studi literatur, dan dari pemeriksaan laboratorium. Teknik pengumpulan data pada penelitian ini yaitu:

a. Observasi

Teknik observasi pada penelitian ini dilakukan dengan pengamatan dan peninjauan langsung proses isolasi DNA pada masing-masing kelompok yaitu kelompok eksperimen (penambahan tahap presipitasi etanol) dan kelompok kontrol (tanpa penambahan tahap presipitasi etanol) untuk membuktikan kebenaran dari sebuah desain penelitian yang dilakukan dan melakukan pencatatan hasil akhir.

b. Studi literatur

Pada penelitian ini studi literatur dilakukan untuk pengumpulan informasi dari sumber-sumber yang sudah ada, serta mencari referensi yang relevan terkait isolasi

DNA, metode perebusan, presipitasi etanol serta kemurnian dan konsentrasi DNA berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya.

c. Pemeriksaan laboratorium

Pemeriksaan laboratorium pada penelitian ini mencakup pengujian eksperimental dan analisis langsung terhadap sampel menggunakan teknik laboratorium yang relevan, yaitu proses ekstraksi dan pengujian tingkat kemurnian DNA bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Spektrofotometer Nanodrop dan uji visualisasi DNA dengan Elektroforesis.

3. Instrumen pengumpulan data

Berikut instrumen pengumpulan data pada penelitian ini:

- a. Alat tulis untuk mencatat hasil pengumpulan data yang diperoleh.
- b. Kertas pengamatan, untuk mencatat atau mengumpulkan hasil dan data saat melalui pengamatan pada penelitian di lapangan.
- c. Handphone, untuk dokumentasi seluruh aktivitas pada saat penelitian berlangsung.
- d. Alat laboratorium (UV Documentation dan Spektrofotometer Nanodrop), yang merupakan instrument untuk mendapatkan data hasil penelitian.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Seluruh pencatatan data yang telah dikumpulkan, selanjutnya dilakukan pengelompokan dan pengolahan data. Pengolahan data adalah tahap dalam penelitian yang bertujuan untuk mengatur dan menyusun data sehingga siap digunakan dalam analisis. Data yang akan dilakukan pengolahan yaitu data hasil kemurnian dan konsentrasi DNA *Staphylococcus aureus* isolasi metode perebusan

tanpa modifikasi presipitasi etanol dan dengan modifikasi presipitasi etanol. Pengolahan data dilakukan dengan perangkat lunak komputer, yang meliputi tahap-tahap seperti *editing*, *coding*, *entry* dan *tabulasi* sehingga diperoleh data yang lengkap dari masing-masing obyek untuk setiap variabel yang diteliti (Nur dan Saihu, 2024).

- a. Pemeriksaan data (*Editing*), merupakan proses melakukan pemeriksaan dan pengumpulan data yang digunakan untuk penelitian.
- b. Pemberian kode (*Coding*), merupakan tahapan kegiatan mengelompokkan atau mengklasifikasikan data dengan pemberian label atau kode berupa numerik (nilai angka). Tujuannya untuk memudahkan dalam pemilahan data dan input data pada proses *entry*.
- c. Pemasukan data (*Entry*), merupakan tahapan memproses data agar dapat dianalisis. Kertas pengamatan dan hasil dokumentasi penelitian dikumpulkan. Data yang dikodekan kemudian dimasukkan ke dalam perangkat lunak statistik agar dapat dianalisis.
- d. Penyusunan data (*Tabulating*), merupakan proses menyajikan data dalam bentuk tabel, grafik, atau daftar. Penyajian ini bertujuan untuk mempermudah dalam melakukan pengamatan, analisis dan evaluasi terhadap data yang telah dikumpulkan, sehingga dapat diperoleh pemahaman yang lebih jelas terkait hasil penelitian.

2. Analisis data

Analisis data dilakukan untuk hasil isolasi DNA bakteri *Staphylococcus aureus* metode perebusan tanpa penambahan tahap presipitasi etanol dan dengan penambahan tahap presipitasi etanol. Langkah-langkah analisis data meliputi:

a. Deskripsi statistik

Lakukan deskripsi statistik seperti mean, median, dan persentil untuk variabel-variabel yang relevan. Hal ini membantu dalam memahami karakteristik dan distribusi data (Agustini. *dkk*, 2024).

b. Uji Normalitas

Pengujian normalitas dilakukan untuk mengevaluasi apakah data hasil penelitian mengikuti pola distribusi normal atau tidak. Uji normalitas pada data penelitian dilakukan dengan penerapan metode Shapiro-Wilk. Pengambilan kesimpulan hasil uji normalitas dapat dilihat dari nilai signifikansi. Apabila hasil uji menunjukkan nilai signifikansi lebih dari 0,05, maka data tersebut dapat dianggap berdistribusi normal. Sebaliknya, jika nilai signifikansi kurang dari 0,05, berarti data tersebut tidak mengikuti distribusi normal (Pratama dan Permatasari, 2021). Jika data berdistribusi normal, uji statistik parametrik dapat digunakan, sementara data yang tidak berdistribusi normal membutuhkan uji statistik non-parametrik.

c. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengetahui kesamaan varians antar beberapa populasi dengan maksud mengonfirmasi bahwa perbedaan statistik yang muncul adalah akibat variasi antar kelompok, bukan akibat perbedaan di dalam masing-masing kelompok (Sianturi, 2022). Uji homogenitas data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Pengambilan kesimpulan hasil uji homogenitas dapat dilihat dari nilai signifikansi. Apabila hasil uji menunjukkan nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka data tersebut dapat dianggap homogen sehingga dapat menggunakan uji statistik parametrik. Sebaliknya, jika nilai

signifikansi kurang dari 0,05 maka data tersebut tidak homogen sehingga membutuhkan uji statistik non-parametrik.

d. Uji Hipotesis

Uji hipotesis dapat menggunakan uji *Independent Sampel T-Test* apabila data berdistribusi normal dan bersifat homogen untuk membandingkan kemurnian dan konsentrasi DNA antara metode perebusan tanpa penambahan tahap presipitasi etanol dan dengan penambahan tahap presipitasi etanol. Jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis data yang digunakan adalah statistik non-parametrik. Dalam hal ini, uji *Mann-Whitney U-test* digunakan untuk membandingkan dua kelompok data yang tidak berpasangan. Dalam pengujian hipotesis ini, keputusan diambil berdasarkan nilai signifikansi yang diperoleh. Apabila nilai signifikansi yang didapatkan kurang dari 0,05, maka hipotesis nol (H_0) tidak dapat diterima sehingga hipotesis alternatif (H_a) dianggap lebih tepat. Sebaliknya, jika nilai signifikansi lebih besar dari 0,05, maka hipotesis nol (H_0) diterima karena tidak ada bukti kuat untuk mendukung hipotesis alternatif (H_a) (Pratama dan Permatasari, 2021).