

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Metode penelitian *True Experiment* diterapkan dalam pelaksanaan penelitian ini karena melibatkan penggunaan sampel eksperimen maupun sampel kontrol yang dipilih secara acak dan peneliti dapat mengatur dan mengendalikan variabel luar yang berpengaruh terhadap hasil penelitian (Sugiyono, 2013). Penelitian ini dilakukan eksperimen pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan dua bahan yang berbeda yaitu menggunakan air tebu dan akuades. Media yang sudah dibuat kemudian dilakukan inokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

Penelitian ini juga dilaksanakan dengan desain penelitian *Posttest Only Control Design* yang merupakan salah satu bentuk dari metode *True Experiment* karena dalam penelitian ini dua kelompok sampel digunakan yang pada setiap kelompok sampel ditentukan melalui proses randomisasi tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*) dan hanya ada pengukuran hasil akhir (*posttest*). Kelompok pertama dilakukan perlakuan yang dikategorikan sebagai kelompok eksperimen, kemudian kelompok lain tidak dilakukan perlakuan sehingga dikategorikan sebagai kelompok kontrol (Sugiyono, 2013). Desain penelitian ini terdapat *posttest 1* dan *posttest 2*. Kelompok data *posttest 1* adalah hasil pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam pada media *Blood Agar Plate* (BAP) pelarut air tebu. Kelompok data *posttest 2* adalah hasil pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam

pada media *Blood Agar Plate* (BAP) pelarut akuades. Desain penelitian ditunjukkan pada Tabel 2. Sebagai berikut :

Tabel 2. Desain Penelitian

	Perlakuan	<i>Posttest</i>
R (Kelompok Eksperimen)	X	O1
R (Kelompok Kontrol)	Y	O2

Sumber : Sugiyono, 2013.

Keterangan :

X : Perlakuan terhadap sampel yaitu pelarut pada media BAP menggunakan pelarut air tebu.

Y : Perlakuan terhadap sampel yaitu pelarut pada media BAP menggunakan pelarut akuades.

O1 : Hasil pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAP pelarut air tebu.

O2 : Hasil pengukuran pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAP pelarut akuades.

Besar minimal pengulangan sampel yang diperlukan untuk melaksanakan penelitian ini sebanyak 16 sampel kelompok media BAP dengan pelarut air tebu dan 16 sampel kelompok media BAP dengan pelarut akuades. Besar minimal pengulangan sampel didapatkan dari perhitungan dibawah ini menggunakan rumus Federer :

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

Keterangan :

r = Banyaknya pengulangan

t = Banyaknya perlakuan

Maka perhitungannya adalah :

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

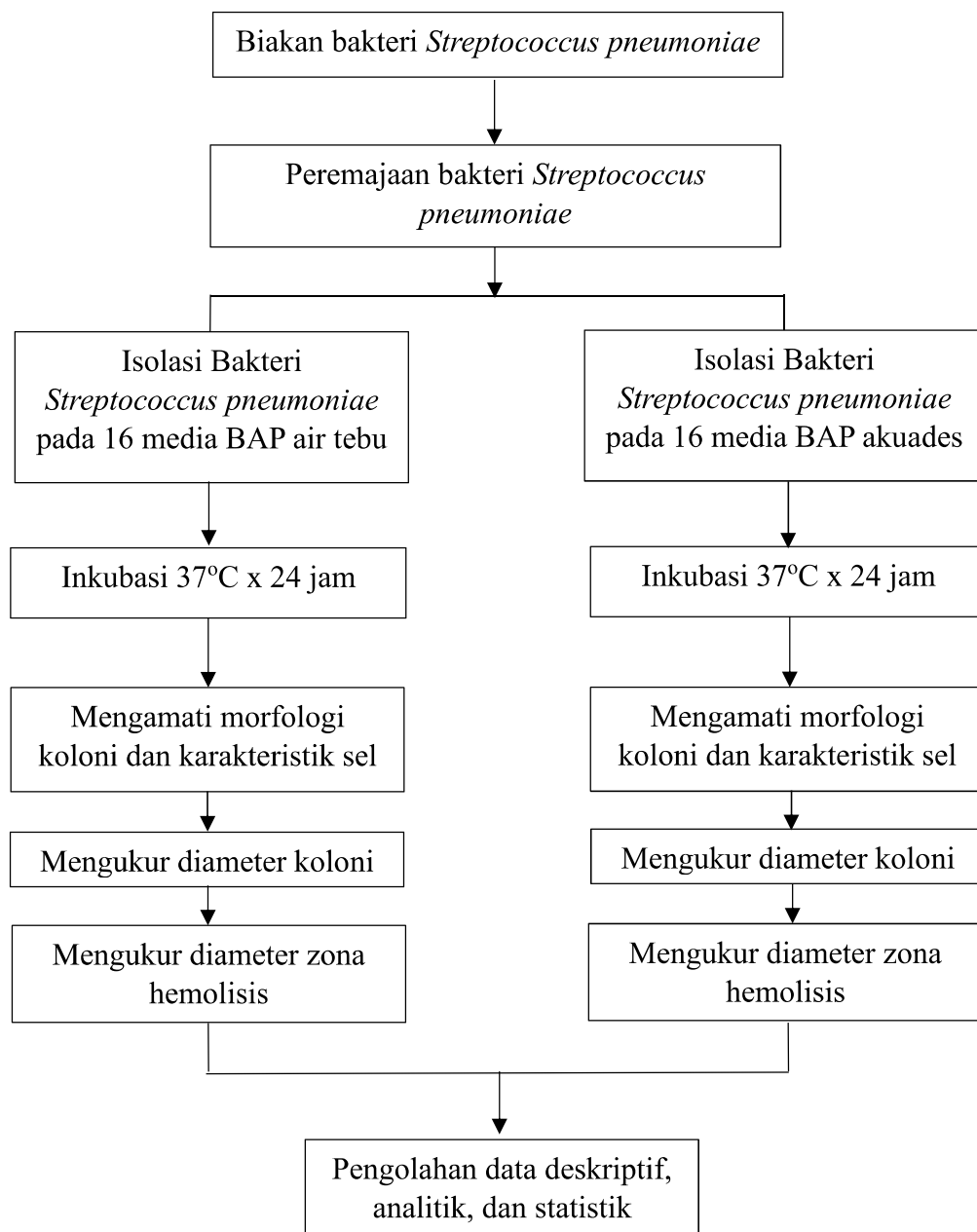
$$(r-1) (2-1) \geq 15$$

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

$$r \geq 16$$

B. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 15. :



Gambar 15. Rancangan Percobaan

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret (UNS) dan telah dilakukan uji identifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

2. Objek Penelitian

Objek penelitian ini menggunakan air tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang berasal dari batang tebu jenis tebu hijau dan tebu madu berkualitas baik, batang besar, segar dan permukaannya halus tanpa kotoran yang berasal dari penjual sari tebu di kota Yogyakarta

D. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

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

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April tahun 2025.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut air tebu (*Saccharum officinarum* L.) dan media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut akuades adalah variabel bebas dari penelitian ini.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah hasil pengamatan morfologi koloni dan karakteristik sel bakteri, hasil rerata diameter koloni bakteri serta hasil rerata diameter zona hemolisis,

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada pelaksanaan penelitian ini adalah kerentanan kontaminasi pada alat yang digunakan, kualitas tebu yang tidak menentu dan sebaran inokulum yang tidak merata antara media BAP dengan pelarut air tebu dan BAP dengan pelarut akuades.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

- a. Media *Blood Agar Plate* (BAP) air tebu (*Saccharum officinarum* L.) adalah media agar darah domba dengan bahan baku *Blood Agar Base* (BAB) dengan penambahan 5-10% darah domba terdefibrinasi yang dilarutkan menggunakan air tebu (*Saccharum officinarum* L.) dengan konsentrasi 2,5% yang didapatkan melalui pengenceran.
- b. Media *Blood Agar Plate* (BAP) akuades adalah media agar darah domba yang berbahan dasar baku *Blood Agar Base* (BAB) dengan penambahan 5-10% darah domba terdefibrinasi yang dilarutkan menggunakan akuades.

2. Variabel Terikat

- a. Hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* adalah koloni membentuk warna keabu-abuan, mukoid, memiliki cekungan

ditengah dan dikelilingi zona hijau membentuk zona hemolisis alfa pada media *blood agar plate*.

- b. Hasil uji morfologi koloni dan karakteristik sel bakteri adalah hasil dari pengamatan morfologi koloni dan sel bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara makroskopis dan mikroskopis yang sebelumnya sudah dilakukan pewarnaan Gram.
 - c. Hasil rerata diameter koloni adalah hasil dari perhitungan diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang tumbuh pada media BAP air tebu (*Saccharum officinarum L.*) dan BAP akuades dalam skala satuan milimeter.
 - d. Hasil rerata diameter zona hemolisis adalah hasil dari perhitungan diameter zona hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang tumbuh pada media BAP air tebu (*Saccharum officinarum L.*) dan BAP akuades dalam skala satuan milimeter.
3. Variabel Pengganggu Terkendali
- a. Kontaminan adalah mikroorganisme seperti bakteri atau jamur selain bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang dapat tumbuh pada media pertumbuhan sehingga dapat mengganggu pengumpulan hasil. Kontaminan ini dapat dikendalikan dengan cara sterilisasi alat dan bahan serta berlaku aseptis saat bekerja.
 - b. Kualitas tebu merupakan tebu yang digunakan dalam penelitian dan kualitasnya tidak menentu. Hal ini dapat dikendalikan dengan cara pemilahan jenis, umur, warna dan karakteristik dari pohon tebu.

- c. Sebaran inokulum yang tidak merata adalah kondisi dimana inokulum yang tersebar tidak homogen antara media BAP air tebu dan BAP akuades yang dapat menyebabkan hasil tidak konsisten. Masalah ini dapat dikendalikan dengan cara memakai mikropipet berukuran 2,5µl pada saat pengambilan spesimen bakteri sesaat sebelum dilakukan inokulasi pada masing-masing media kemudian dilakukan inokulasi menggunakan metode cawan gores.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini memanfaatkan data primer yang secara langsung dikumpulkan dari objek penelitian yang melalui proses observasi dan pengukuran. Data hasil penelitian yang dilakukan di laboratorium mikrobiologi berupa data pengamatan morfologi koloni dan karakteristik sel bakteri, data rata-rata diameter koloni dan rata-rata diameter zona hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang tumbuh pada media BAP air tebu dan BAP akuades yang masing-masing memiliki 16 pengulangan sehingga didapatkan 32 data pada masing-masing kelompok.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a. Ose bulat
 - b. Mikropipet 10µl
 - c. Tip kuning mikropipet
 - d. Jangka sorong
 - e. Gelas kimia

- f. Gelas ukur
 - g. Labu Erlenmeyer
 - h. Bunsen
 - i. Kapas
 - j. Kertas HVS
 - k. Plastik
 - l. Kertas timbang
 - m. Kertas saring
 - n. Korek api
 - o. Oven
 - p. *Autoclave*
 - q. Inkubator
 - r. Neraca analitik
 - s. *Petridish disposable*
 - t. Tabung reaksi
 - u. Spidol
2. Bahan
- a. Air tebu (*Saccharum officinarum L.*)
 - b. *Blood Agar Base*
 - c. Darah domba
 - d. Suspensi bakteri *Streptococcus pneumoniae*
 - e. Akuades
 - f. Kristal violet

- g. Lugol/Iodin
- h. Alkohol
- i. Safranin
- j. Minyak imersi

I. Uji Validitas dan Reabilitas

Uji validitas dan reabilitas instrumen perlu dilaksanakan guna memastikan bahwa hasil penelitian valid. Instrumen yang valid merupakan alat ukur yang difungsikan untuk guna mengukur parameter yang relevan. Instrumen valid adalah alat ukur yang menghasilkan data yang valid, sehingga data yang diperoleh sesuai dengan data yang sebenarnya. Sedangkan instrumen realibel adalah alat ukur yang menghasilkan data konsisten dalam beberapa kali pengukuran (Sugiyono, 2013).

Penelitian ini mengukur diameter koloni bakteri dan diameter zona hemolisis menggunakan jangka sorong yang telah terkalibrasi dan dinyatakan dalam skala satuan milimeter. Tidak ada koloni bakteri dan zona hemolisis yang terhitung ulang selama proses menghitung diameternya. Untuk mengatasi hal ini, spidol digunakan untuk menandai koloni bakteri dan zona hemolisis yang sudah dihitung. Pengukuran pada masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 16 kali pada media BAP air tebu dan 16 kali pada media BAP akuades.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan
 - a. Perizinan

Melakukan perizinan untuk melaksanakan penelitian di lingkungan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta terutama di Laboratorium Mikrobiologi.

b. Kaji Etik

Kaji etik dilakukan agar dapat melaksanakan penelitian di lingkungan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

c. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dapat dimulai dengan pencucian alat, kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas HVS selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam oven dengan suhu 80°C selama 8 jam.

2. Persiapan Bahan Darah dan Air Tebu

a. Darah Domba

Penelitian ini menggunakan darah domba yang diambil secara aseptis pada bagian leher domba.

b. Air Tebu

Penelitian ini menggunakan air tebu (*Saccharum officinarum* L.) sebagai pelarut media *Blood Agar Plate* (BAP). Tebu yang digunakan adalah tebu yang dari batang berkualitas baik dan permukaannya halus tanpa kotoran. Tebu kemudian digiling sehingga menghasilkan air tebu dan disaring agar terpisah dari kotoran yang ada.

3. Pembuatan Media

a. Media BAP Air Tebu

- 1) Dibuat air tebu dengan konsentrasi pengenceran 2,5% pada volume akuades 400 ml.

- a) Rumus pembuatan konsentrasi :

Volume zat = konsentrasi x volume larutan

$$\text{Volume zat} = \frac{2,5}{100} \times 400 \text{ ml}$$

Volume zat = 10 ml air tebu

- b) Prosedur pembuatan konsentrasi :

Ukur 10 ml air tebu yang akan digunakan kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 400 ml.

- 2) Ditimbang bahan baku *blood agar base* sebanyak 16 gram, kemudian masukkan kedalam labu erlenmeyer.
- 3) Ditambahkan air tebu dengan konsentrasi pengenceran yang sudah dibuat sebelumnya kemudian dilarutkan hingga homogen.
- 4) Selanjutnya tutup labu Erlenmeyer dengan kapas dan bungkus dengan plastik, kemudian sterilkan pada autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- 5) Setelah 15 menit, ditunggu suhu turun dan dikeluarkan sisa-sisa uap dan air.
- 6) Tunggu sampai suhu media menghangat sekitar 50°C
- 7) Ditambahkan darah domba sebanyak 5%-10% kemudian dicampur sampai homogen.

- 8) Dituang kedalam cawan petri steril secara aseptis dengan volume sekitar 20 ml per cawan petri.
- 9) Ditunggu media hingga memadat.
- b. Media BAP Aquades
 - 1) Ditimbang bahan baku *blood agar base* sebanyak 16 gram, kemudian masukkan kedalam labu erlenmeyer.
 - 2) Dilarutkan bahan baku dengan menggunakan akuades dengan volume 400 ml kemudian dihomogenkan.
 - 3) Selanjutnya tutup labu Erlenmeyer dengan kapas dan bungkus dengan plastik, kemudian sterilkan pada autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
 - 4) Setelah 15 menit, ditunggu suhu turun dan dikeluarkan sisa-sisa uap dan air.
 - 5) Tunggu sampai suhu media menghangat sekitar 50°C
 - 6) Ditambahkan darah domba sebanyak 5%-10% kemudian dicampur sampai homogen.
 - 7) Dituang kedalam cawan petri steril secara aseptis dengan volume sekitar 20 ml per cawan petri.
 - 8) Ditunggu media hingga memadat.
4. Pembuatan dan Identifikasi Bakteri Uji
 - a. Isolat murni bakteri *Streptococcus pneumoniae* diinokulasikan pada media *blood agar tube* dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

- b. Identifikasi pada media *blood agar tube* menggunakan pewarnaan Gram dengan hasil koloni gram positif yang berbentuk oval atau menyerupai lanset dengan formasi berantai pendek dan berpasangan.
5. Inokulasi Bakteri Uji pada Media
- a. Diambil suspensi bakteri menggunakan mikropipet steril 2,5µl secara aseptis.
 - b. Ditetaskan suspensi bakteri di atas media BAP air tebu dan BAP akuades.
 - c. Digoreskan suspensi bakteri pada media menggunakan ose dengan teknik cawan gores.
 - d. Diinokulasi pada media BAP air tebu sebanyak 16 kali dan media BAP akuades sebanyak 16 kali.
 - e. Inkubasikan media BAP air tebu dan media BAP akuades yang sudah diinokulasikan bakteri pada inkubator dengan temperatur 37°C selama 1 x 24 jam.
6. Pengamatan Hasil Pertumbuhan
- a. Pengamatan Uji Morfologi Koloni
 - 1) Diambil dari inkubator media BAP air tebu dan media BAP akuades.
 - 2) Secara makroskopis, diamati pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* media BAP air tebu dan akuades.

- 3) Diamati morfologi koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara mikroskopis menggunakan mikroskop setelah pewarnaan Gram.
- b. Perhitungan Rerata Diameter Koloni
 - 1) Diambil dari inkubator media BAP air tebu dan media BAP akuades.
 - 2) Mengamati dan menghitung diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* menggunakan jangka sorong.
 - c. Perhitungan Rerata Diameter Koloni
 - 1) Diambil dari inkubator media BAP air tebu dan media BAP akuades.
 - 2) Mengamati dan menghitung diameter zona hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae* menggunakan jangka sorong.

K. Manajemen Data

1. Penyajian Data

Pengolahan data dilaksanakan ketika data sudah terkumpul secara keseluruhan. Penelitian ini memanfaatkan data primer langsung dikumpulkan dari objek penelitian dan telah melalui proses observasi dan pengukuran. Data pengamatan morfologi koloni dan karakteristik sel bakteri akan disajikan dalam bentuk dokumentasi makroskopis dan mikroskopis. Sedangkan penyajian data untuk hasil rerata diameter koloni dan rerata zona hemolisis dilakukan melalui tabel dan diagram batang menggunakan satuan milimeter (mm).

2. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh kemudian dianalisis deskriptif untuk menggambarkan hasil pengamatan morfologi koloni dan karakteristik sel bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam pada media BAP air tebu dibandingkan media BAP akuades. Selanjutnya dilakukan analisis deskriptif untuk menggambarkan rerata diameter koloni dan rerata zona hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam pada media BAP air tebu dan media BAP akuades.

3. Analisis Analitik

Data yang diperoleh merupakan hasil pengukuran diameter koloni dan diameter zona hemolisis bakteri pada media BAP air tebu dan media BAP akuades. Data yang diperoleh kemudian dihitung nilai rerata, selisih rerata dan persentase efektivitas kemudian dilakukan interpretasi tingkat efektivitas media BAP air tebu dibandingkan media BAP akuades. Pada analisis analitik efektivitas digunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Rerata hasil diameter pertumbuhan bakteri pada media BAP air tebu}}{\text{Rerata hasil diameter pertumbuhan bakteri pada media BAP akuades}} \times 100\%$$

Hasil persentase kemudian dibandingkan dengan kriteria tingkat efektivitas sesuai pada tabel 3.

Tabel 3. Kriteria Tingkat Efektivitas

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

Sumber : yuliandawati, 2018.

4. Analisis Statistik

Data yang didapatkan merupakan hasil pengukuran diameter koloni dan diameter zona hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAP air tebu dan media BAP akuades yang kemudian dilakukan diuji statistik meliputi normalitas menggunakan SPSS 21.0 Windows untuk mengetahui sebaran data atau uji normalitas data. Berikut ini adalah hipotesis yang digunakan dalam pengambilan keputusan untuk uji normalitas data :

H_0 : Data berdistribusi normal apabila $Asymp.Sig \geq 0,05$

H_a : Data tidak berdistribusi normal apabila $Asymp.Sig < 0,05$

Data yang telah dilakukan uji distribusi dan diperoleh hasil data berdistribusi normal, selanjutnya diuji homogenitasnya agar dapat diketahui bahwa data yang diperoleh homogen atau tidak. Uji data H_0 diterima apabila $Asymp.Sig \geq 0,05$ dan data dinyatakan homogen.

Data yang berdistribusi normal diuji statistik *Independent Sampel T Test* untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAP air tebu dan media BAP akuades. Sedangkan data yang berdistribusi tidak normal akan dilakukan uji *Mann Whitney U (2 Independent Samples)*. Berikut hipotesis yang digunakan untuk pengambilan keputusan :

H_0 : Tidak ada perbedaan hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air tebu dan media *Blood Agar Plate* (BAP) akuades.

H_a : Ada perbedaan hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air tebu dan media *Bood Agar Plate* (BAP) akuades.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dengan nomor No.DP.04.03/e-KEPK.1/466/2025 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Persetujuan tersebut diperoleh setelah peneliti mengajukan dokumen proposal Karya Tulis Ilmiah secara resmi dan dinyatakan layak secara etis oleh pihak komite etik sesuai dengan standar dan ketentuan penelitian yang berlaku.