

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen murni (*True Experiment design*), yaitu penelitian yang dilakukan dalam kondisi terkendali dan digunakan untuk mencari pengaruh yang muncul pada suatu variabel akibat dari perlakuan atau intervensi terhadap variabel lain. Eksperimen murni memiliki ciri-ciri yaitu sample yang digunakan untuk kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dipilih secara acak atau random dari populasi tertentu (Sugiyono, 2013).

Pada penelitian ini dilakukan pelarut eksperimen pembuatan *Blood Agar Plate* (BAP) dengan dua bahan yang berbeda yaitu menggunakan aquades dan air kelapa. Media yang telah dibuat kemudian dilakukan inokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Variabel terikat (*variable dependen*) pada penelitian ini hasil nilai diameter *Streptococcus pneumoniae*.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *Posttest-Only Control Desain*, dikarenakan pada penelitian ini terdapat 2 kelompok sample yaitu kelompok sample kontrol dan kelompok sample eksperimen, serta kedua kelompok sample tersebut diambil secara random (Sugiyono, 2013).

Pada desain penelitian ini terdapat *posttest* 1 dan *posttest* 2. Kelompok data *posttest* 1 adalah hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut aquades. Kelompok data *posttest* 2 adalah hasil pengukuran diameter koloni *Streptococcus pneumoniae* yang ditanam pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut air kelapa. Desain penelitian ditunjukkan pada

Tabel 2. Desain penelitian Sebagai berikut :

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

Sumber : Sugiyono, 2013

Keterangan :

R : Randomisasi sample

X : Perlakuan terhadap sample yaitu pelarut pada media BAP menggunakan air kelapa

Y : Perlakuan terhadap kontrol yaitu pelarut pada media BAP menggunakan aquades

O1 : Hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah pelarut air kelapa

O2 : Hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah pelarut aquades

Pada penelitian ini penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini diperoleh dari rumus Frederer sebagai berikut :

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

Keterangan :

t : *treatment* (Banyak perlakuan)

r : *replication* (Banyak Pengulangan)

15 : derajat kebebasan umum

Maka perhitungannya sebagai berikut :

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

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

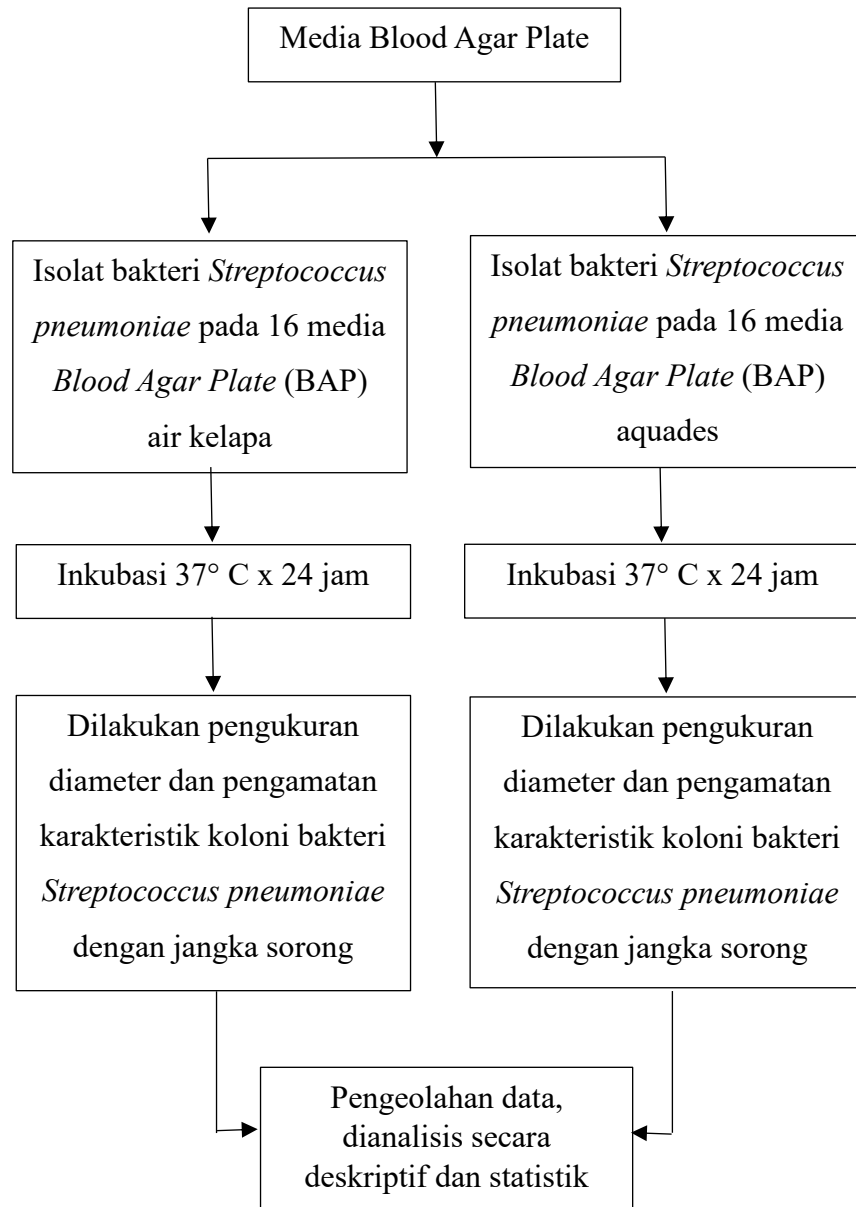
$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 16$$

Besar pengulangan sample diperlukan adalah 16 sample kelompok media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut air kelapa dan 16 kelompok media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut aquades.

B. Alur Penelitian

Rancangan percobaan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3



Gambar 3. Alur Penelitian

C. Subyek dan Obyek

1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

2. Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah air kelapa dengan konsentrasi 100 %.

Ciri-ciri air kelapa yang digunakan yaitu kelapa dengan jenis kelapa hijau (*Cocos nicifera*), daging kelapa berwarna putih tebal, baktoknya berwarna coklat dan keras, sabut kelapa masih tebal serta tidak bertunas.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada tanggal 14-18 April 2025

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*Variable independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades.

2. Variabel Terikat (*Variable dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil pertumbuhan diameter dan morfologi koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

3. Variabel Pengganggu (*Confounding variable*)

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah kontamonasi bakteri.

4. Skala Nominal (*Variable Nominal*)

Skala nominal pada penelitian ini adalah jenis media pertumbuhan dan sumber pelarut.

5. Skala Ordinal (*Variable Ordinal*)

Skala ordinal pada penelitian ini adalah tingkat eektivitas media pertumbuhan, kualitas pertumbuhan bakteri, hasil uji biokimia serta tingkat koloni bakteri.

6. Skala Interval (*Variable Interval*)

Skala interval pada penelitian ini adalah suhu inkubasi, waktu inkubasi dan diameter koloni bakteri.

7. Skala Rasio (*Variable Rasio*)

Skala rasio pada penelitian ini adalah konsentrasi nutrisi dalam media dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa adalah media pertumbuhan bakteri dengan agar darah domba yang berbahan baku *Blood Agar Base*

(BAB) yang dilarutkan dengan air kelapa yang digunakan yaitu kelapa dengan jenis kelapa hijau (*Cocos nicifera*), daging kelapa berwarna putih tebal, baktoknya berwarna coklat dan keras, sabut kelapa masih tebal serta tidak bertunas. Menggunakan 400 ml air kelapa dengan satuan ml untuk melarutkan 16 gram *Blood Agar Base* (BAB) atau untuk 16 buah cawan petri dengan satuan gram dan menggunakan skala nominal yaitu sumber pelarut.

2. Media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades adalah media pertumbuhan bakteri dengan agar darah domba yang berbahan baku *Blood Agar Base* (BAB) yang dilarutkan dengan aquades. Menggunakan 400 ml aquades dengan satuan ml unntuk melarutkan 16 gram *Blood Agar Base* (BAB) atau untuk 16 buah cawan petri dengan satuan gram dan menggunakan skala nominal yaitu sumber pelarut.
3. Hasil pertumbuhan diameter dan karakteristik koloni adalah hasil dari pengukuran diameter dan pengamatan karakteristik koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades. Diameter diukur menggunakan jangka sorong digital dalam satuan milimeter (mm). Menggunakan skala interval yaitu pengukuran dan pengamatan koloni.
4. Suhu inkubasi adalah suhu yang perlu diperhatikan untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme yang akan diteliti. Bakteri *Streptococcus pneumoniae* tumbuh optimal padda suhu 37° C (Saputro, 2013). Suhu

inkubasi pada pertumbuhan bakteri dalam penelitian ini adalah 37° C.

Dengan satuan celcius dan skala interval yaitu suhu inkubasi.

5. Waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan suatu mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang sehingga dapat diamati dengan baik. Waktu inkubasi yang optimal untuk pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* adalah 24-48 jam (Saputro, 2013). Waktu yang diperlukan untuk inkubasi bakteri sebelum dilakukan pengamatan yaitu selama 48 jam untuk mendapatkan hasil pertumbuhan yang baik. Dengan satuan jam dan skala interval yaitu waktu inkubasi.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data adalah salah satu langkah utama untuk mendapatkan data penelitian. Terdapat dua sumber data yaitu data sekunder dan data primer. Data sekunder adalah sumber data yang memberikan data secara tidak langsung kepada pengumpul data. Sedangkan, data primer adalah sumber data yang memberikan data secara langsung kepada pengumpul data (Sugiyono, 2013).

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer yaitu data yang diperoleh secara langsung dari obyek penelitian oleh peneliti (Sugiyono, 2013). Data diperoleh dari hasil percobaan dilaboratorium berupa hasil pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diukur diameter koloninya pada media BAP air kelapa dan media BAP aquades

dengan masing-masing 16 kali pengulangan atau sebanyak 32 data. Teknik yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *Simple Random Sampling*.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| a. Cawan petri | k. Oven |
| b. Pipet ukur | l. Kapas non absorb |
| c. Pipet Pasteur | m. Autoklaf |
| d. Labu Erlenmeyer | n. Spidol |
| e. Ose bulat | o. Lampu Bunsen |
| f. Jangka sorong digital | p. Plate |
| g. Incubator | q. Objek glass |
| h. Tabung reaksi | r. Mikroskop |
| i. Neraca teknis | s. Kertas saring |
| j. Kertas | t. Spektrofotometer UV-Vis |

2. Bahan

- a. Darah domba
- b. Bahan baku media *Blood Agar Base*
- c. Air kelapa
- d. Aquades
- e. Biakan murni bakteri *Streptococcus pneumoniae*

- f. Standar *McFarland* 0,5 %
- g. NaCl Isotonik
- h. Cat gram

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas dan reabilitas instrument perlu dilakukan untuk memperoleh hasil penelitian yang valid dan reliabel. Valid yaitu alat ukur tersebut digunakan untuk mengukur apa yang seharusnya diukur. Instrument valid adalah alat ukur yang digunakan menghasilkan data yang valid, sehingga terdapat kesamaan data yang terkumpul dengan data yang sesungguhnya. Sedangkan, instrument reliabel adalah alat ukur yang menghasilkan data yang sama dalam beberapa kali pengukuran atau konsisten (Sugiyono, 2013).

Penelitian ini menggunakan jangka sorong sebagai alat ukur diameter koloni bakteri dan dinyatakan dalam satuan milimeter. Dalam proses penghitungan dipastikan tidak ada bakteri yang terhitung ulang dikarenakan diberi tanda dengan spidol. Pengulangan pengukuran dilakukan masing-masing sebanyak 16 kali pada media BAP air kelapa dan 16 kali pada media BAP aquades. Uji validitas jangka sorong menggunakan metode yaitu blok ukur dengan mengukur beberapa blok dan membandingkan hasilnya dengan nilai sebenarnya, mikrometer kalibrasi dengan membandingkan hasil pengukuran jangka sorong dengan mikrometer kalibrasi yang sudah dikalibrasi sebelumnya untuk memastikan kesesuaian dan pengujian dengan objek standar dengan

mengukur pada enda dengan ukuran tetap yang sudah diketahui panjangnya seperti batang logam dengan diameter atau panjang tertentu.

Untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus pneumoniae* diperlukan mikroskop untuk mengetahui karakteristik bakteri tersebut. Pengecekan bakteri dilakukan pada semua plate untuk memastikan semua bakteri yang tumbuh adalah bakteri uji. Uji validitas mikroskop dilakukan dengan menggunakan preparat kontrol untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan bakteri uji, pemeriksaan resolusi mikroskop untuk memastikan apakah mikroskop dapat memisahkan detail kecil sesuai dengan spesifikasinya, pengujian fungus optik untuk memastikan lensa tidak ada distorsi, bayangan ganda atau gangguan visual lainnya dan cross-validation dengan mikroskop lainnya untuk memastikan hasil pengamatan mikroskop yang diuji sama dengan hasil mikroskop yang sudah dikalibrasi.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Perizinan

Melakukan perizinan untuk penelitian di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Media Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

b. Sterilisasi alat

Mensterilkan alat seperti : cawan petri, pipet, tabung dan labu elenmeyer lalu distrerilkan di dalam oven pada suhu 100 C selama 8 jam.

c. Menyiapkan bahan

Menyiapkan bahan-bahan yang akan digunakan seperti : alkohol, aquades bahan baku media *Blood Agar Base*, serbuk NaCl.

d. Penyiapan Air Kelapa

Penelitian ini menggunakan air kelapa sebagai pelarut *Blood Agar Plate* (BAP). Ciri-ciri air kelapa yang digunakan yaitu kelapa dengan jenis kelapa hijau (*Cocos nicifera*), daging kelapa berwarna putih tebal, baktoknya berwarna coklat dan keras, sabut kelapa masih tebal serta tidak bertunas. Air kelapa yang akan digunakan disaring menggunakan kertas saring sehingga kotoran yang ada bisa terpisah.

e. Pembuatan larutan *McFarland* 0,5

- 1) Membuat larutan barium Klorida (BaCl_2) dengan menimbang barium klorida (BaCl_2) dan melarutkan dalam 100 ml aquades
- 2) Pipet dan ditambahkan 10,03 ml asam silfat 97 % (H_2SO_4) ke dalam 98,97 ml aquades
- 3) Ditambahkan 0,05 ml larutan BaCl_2 ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 9,95 ml larutan H_2SO_4 lalu dihomogenkan

f. Pembuatan larutan garam isotonic

- 1) Ditimbang 0,85 g bubuk NaCl murni dan dimasukkan ke dalam labu erlemeyer.
- 2) Ditambahkan 100 ml aquades hingga NaCl larut sempurna.
- 3) Sesuaikan pH larutan NaCl menggunakan NaOH dan HCL hingga pH larutan 7.
- 4) Ditutup larutann dengan kaps dan plastic lalu disterilkan dalam autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit.

g. Pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa

- 1) Ditimbang 16 gram bahan baku *Blood Agar Plate* lalu dimasukkan ke dalam labu erlemeyer.
- 2) Ditambahkan 400 ml air kelapa dan dilarutkan hingga homogen.
- 3) Ditutup labu erlemeyer dengan kapas, bungkus dalam plastic dan distrerilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.
- 4) Ditunggu hingga 15 menit hingga suhu turun dan sisa air dan uap keluar. Media dibiarkan hingga hangat sekiranya 50° C.
- 5) Ditambahkna darah domba yang sudah suhu kamar sebanyak 7 % (28ml/400 ml media) kemudian dicampurkan hingga homogen.
- 6) Dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik kurang lebih sebanyak 20 ml per cawan.
- 7) Ditunggu hingga media memadat.

- 8) Dibungkus media yang sudah memadat dengan kertas secara terbalik sehingga uap air hasil kondensiasi tidak mengenai media.
 - 9) Disimpan media di dalam kulkas jika belum segera digunakan.
- h. Pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades
- 1) Ditimbang 16 gram bahan baku *Blood Agar Plate* lalu dimasukkan ke dalam labu erlemeyer.
 - 2) Ditambahkan 400 ml aquades dan dilarutkan hingga homogen.
 - 3) ditutup labu erlemeyer dengan kapas, bungkus dalam plastic dan distrerilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.
 - 4) Ditunggu hingga 15 menit hingga suhu turun dan sisa air dan uap keluar. Media dibiarkan hingga hangat sekiranya 50° C.
 - 5) Ditambahkan darah domba yang sudah suhu kamar sebanyak 7 % (28ml/400 ml media) kemudian dicampurkan hingga homogen.
 - 6) Dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik kurang lebih sebanyak 20 ml per cawan.
 - 7) Ditunggu hingga media memadat.
 - 8) Dibungkus media yang sudah memadat dengan kertas secara terbalik sehingga uap air hasil kondensiasi tidak mengenai media.
 - 9) Disimpan media di dalam kulkas jika belum segera digunakan.

2. Persiapan bakteri uji

a. Pengecekan bakteri uji

- 1) Diambil biakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* murni dengan ose bulat.
- 2) Diinokulasi biakan ke media NA tabung secara *zig-zag*.
- 3) Diinkubasi pada incubator dengan suhu 37° C selama 24 jam.
- 4) Dilakukan uji biokimia menggunakan media gula-gula, TSIA, SIM dan SC.

b. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pneumoniae*

- 1) Diambil biakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dari media NA dengan ose bulat.
- 2) Dilarutkan dalam larutan NaCl.
- 3) Dimasukkan larutan yang sudah tercampur dengan NaCl ke dalam kuvet sebanyak 2 ml.
- 4) Diukur nilai absorbannya dengan alat spektrofotometer UB-Vis pada panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui kekeruhan pada suspensi bakteri.

3. Tahap Pelaksanaan

a. Inokulasi bakteri uji pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa

- 1) Diambil suspensi bakteri menggunakan ose.
- 2) Digoreskan suspensi pada media dengan teknik kuadran.

- 3) Diinokulasi sebanyak 16 kali pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa.
 - 4) Diberi tanda atau kode dengan label pada cawan menggunakan spidol agar tidak tertukar.
 - 5) Media yang sudah ditanami dimasukkan kedalam inkubator untuk diinkubasi selama 24 jam.
- b. Inokulasi bakteri uji pada media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades
- 1) Diambil suspensi bakteri menggunakan ose.
 - 2) Digoreskan suspensi pada media dengan teknik kuadran.
 - 3) Diinokulasi sebanyak 16 kali pada media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades.
 - 4) Diberi tanda atau kode dengan label pada cawan menggunakan spidol agar tidak tertukar.
 - 5) Media yang sudah ditanami dimasukkan kedalam inkubator untuk diinkubasi selama 24 jam.
- c. Pengamatan hasil pertumbuhan bakteri
- 1) Diamati morfologi koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* seperti, warna, bentuk dan tepian.
 - 2) Mengamati secara mikroskopis dalam melakukan pengecetan garam A-B-C-D dan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000x.

- 3) Diukur diameter koloni menggunakan jangka sorong digital dengan satuan milimeter (mm). Koloni yang dipilih adalah koloni Tunggal terbesar pada setiap plate.
- 4) Ulangi pengamatan pada 16 media BAP air kelapa dan 16 media BAP aquades.
- 5) Dicatat hasil pengamatan.

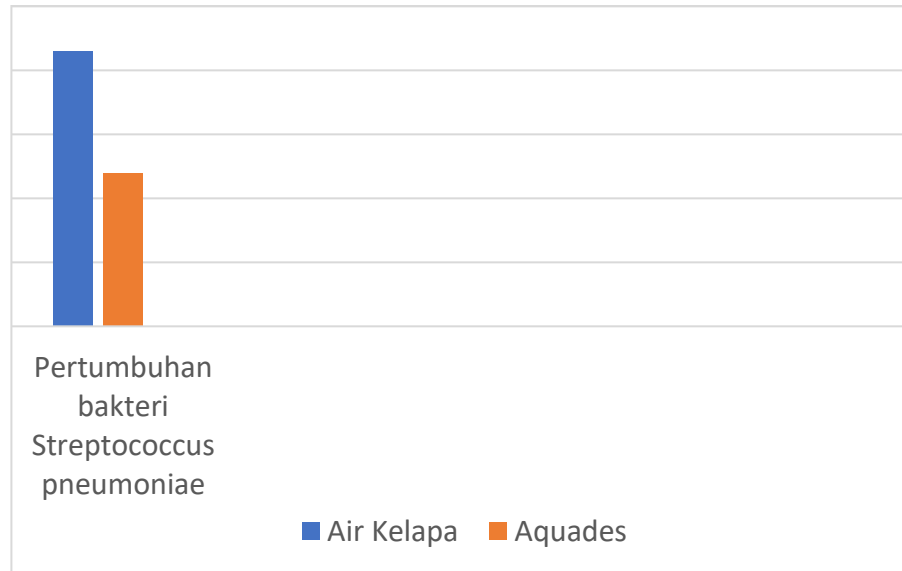
K. Manajemen Data

1. Penyajian Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk table dan grafik sebanyak 32 buah dan dianalisis menggunakan teknik analitik, deskriptif, analisis analitik dan analisis statistik.

2. Analisis Deskriptif

Data yang terkumpul disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis untuk menggambarkan karakteristik diameter pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* yang ditumbuhkan pada masing-masing media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades. Analisis deskriptif dilakukan terhadap seluruh data dan divisualisasikan dalam bentuk grafik batang untuk menunjukkan secara jelas perbedaan pertumbuhan diameter bakteri.



3. Analisis analitik

Data yang diperoleh merupakan hasil pengukuran diameter dan morfologi koloni bakteri pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan media *Blood Agar Plate* (BAP) aquades. Berdasarkan data yang diperoleh, dihitung rerata, selisih rerata dan persentase efektivitas untuk mengetahui derajat efektivitas media BAP air kelapa dibandingkan dengan BAP aquades. Saat menganalisis efektivitas secara analitik, rumus yang digunakan sebagai berikut :

$$\frac{\text{Rerata diameter koloni pada media BAP air kelapa}}{\text{Rerata diameter koloni pada media BAP aquades}} \times 100 \%$$

Hasil presentase kemudiam dibandingkan dengan kriteria Tingkat efektivitas sesuai pada:

Tabel 3. Persentase Kriteria Efektifitas

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

Sumber : Hanifah, 2024

4. Analisis Statistik

Data yang didapatkan merupakan hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumonia* pada *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan *Blood Agar Plate* (BAP) aquades yang diuji normalitas menggunakan SPSS 16.0 windows untuk mengetahui sebaran data atau uji normalitas data. Hipotesis dalam pengambilan Keputusan uji normalitas data adalah sebagai berikut :

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

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

Data yang berdistribusi normal diuji statistic Independent Sample T Test untuk mengetahui pertumbuhan *Streptococcus pneumoniea* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan *Blood Agar Plate* (BAP) aquades. Sedangkan, data yang berdistribusi tidak normal diuji statistic *Mann Whitney U (2 Independent Samples)*. Hipotesis statistik sebagai dasar pengambilan keputusan adalah :

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

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

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh Surat Keterangan Layak Etik Nomer DP.04.03/e-KEPK.1/614/2025 dari Komite Etik Penelitian Politeknik Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

Untuk memperoleh surat kelayakan etik ini sendiri memiliki kendala dalam mendapat etik penelitian adalah waktu untuk mendapatkannya lumayan lama. Dalam penelitian sendiri kesulitan yang didapatkan adalah memperoleh bahan baku yang digunakan sebagai penelitian seperti darah domba dan biakan bakteri murni itu sendiri.