

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

##### **1. Jenis penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen murni (*True Experiment Research*), yaitu penelitian eksperimen yang sesungguhnya, dengan mengontrol variabel secara cermat serta mengendalikan situasi penelitian untuk meminimalkan ancaman yang dapat memengaruhi hasil penelitian (Yusuf, 2014). Pada penelitian ini penelitian eksperimen dilakukan untuk mengetahui hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP menggunakan variabel kontrol yaitu pelarut air kelapa dan akuades.

Pada penelitian ini metode eksperimen murni yaitu peneliti mendapatkan data penelitian secara langsung dengan dilakukan pengujian air kelapa sebagai pelarut media agar darah. Air kelapa yang digunakan yaitu air kelapa tua dan diuji pada laboratorium sebagai pembanding pada uji eksperimen air kelapa sebagai pelarut yaitu menggunakan akuades. Setelah dilakukan penelitian didapatkan hasil pertumbuhan bakteri sehingga data diperoleh untuk pembanding uji pada media BAP dengan pelarut air kelapa dan media dengan pelarut aquades.

## 2. Desain penelitian

Penelitian menggunakan *Post Test Only With Control Group Design* yaitu tidak dilakukan uji pendahuluan sebagai pembanding hasil sehingga tidak diketahui seberapa besar perubahan yang terjadi pada hasil pertumbuhan bakteri uji. Pada desain penelitian ini terdapat 2 kelompok yang dipilih secara acak. Kelompok pertama digunakan sebagai eksperimen yaitu bahan uji dilakukan perlakuan khusus dan pengukuran pada diameter koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP menggunakan air kelapa. Kelompok kedua digunakan sebagai kontrol yaitu tidak ada perlakuan khusus karena bahan uji bersifat netral dan pengukuran pada diameter koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP menggunakan pelarut aquades.

Tabel 3. Desain Penelitian Menggunakan *Post Test Only With Control Group Design*

| Sampel                  | Perlakuan | Post-test      |
|-------------------------|-----------|----------------|
| R (Kelompok Eksperimen) | X         | O <sub>1</sub> |
| R (Kelompok Kontrol)    | Y         | O <sub>2</sub> |

Keterangan :

R : Randomisasi sampel

X : Media *Blood Agar Plate* (BAP) menggunakan pelarut air kelapa

Y : Media *Blood Agar Plate* (BAP) menggunakan pelarut aquades

O<sub>1</sub> : Diameter koloni bakteri pada media *Blood Agar Plate*

(BAP) menggunakan pelarut air kelapa

O<sub>2</sub> : Diameter koloni bakteri pada media *Blood Agar Plate*

(BAP) menggunakan pelarut aquades

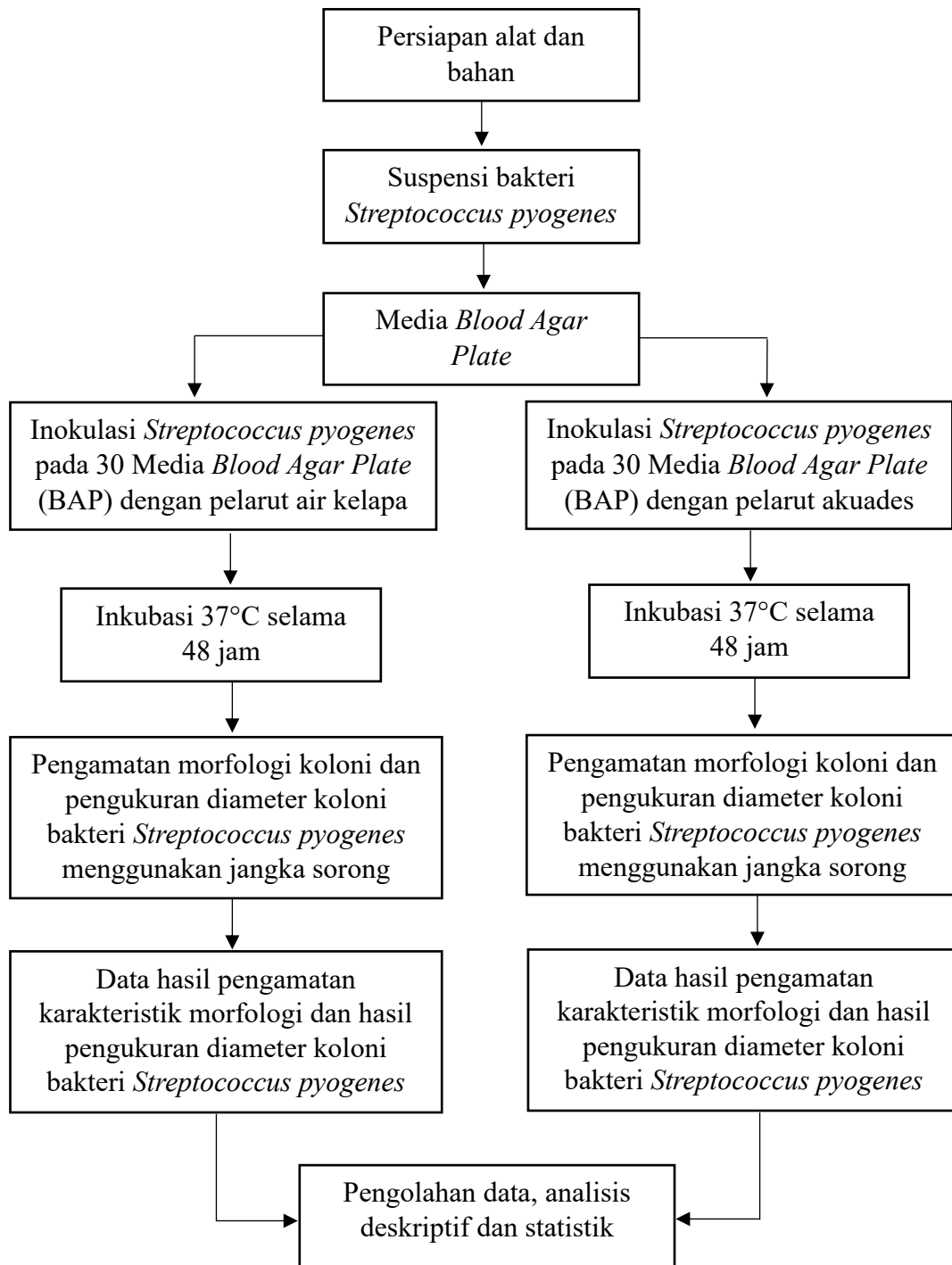
Dalam penentuan jumlah sampel yang digunakan Sugiyono, (2020) memberikan saran tentang ukuran sampel untuk penelitian sebagai berikut :

1. Ukuran sampel yang layak dalam penelitian adalah antara 30 sampai dengan 500.
2. Bila sampel dibagi dalam kategori maka jumlah anggota sampel setiap kategori minimal 30.

Berdasarkan pendapat Sugiyono (2020), ukuran sampel yang layak dalam penelitian yaitu antara 30 sampai dengan 500. Pada penelitian ini mengambil jumlah data sebanyak 30 data untuk menentukan jumlah *plate* atau media BAP yang digunakan dalam penelitian.

## B. Alur Penelitian

Alur penelitian ini ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Alur Penelitian

### **C. Subjek dan Obek**

#### **1. Subjek penelitian**

Subjek penelitian ini yaitu biakan murni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### **2. Objek penelitian**

Objek penelitian ini yaitu air kelapa tua. Air kelapa tua adalah air kelapa tua dengan ciri-ciri daging kelapa putih keras, memiliki batok kelapa coklat kehitaman dan tidak tumbuh tunas. Air kelapa tua didapatkan dari pasar penjual kelapa.

### **D. Waktu dan Tempat**

#### **1. Waktu penelitian**

Penelitian dilakukan pada tanggal 17 April – 5 Mei 2025.

#### **2. Tempat penelitian**

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

### **E. Variabel Penelitian**

#### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu Media *Blood Agar Plate* (BAP) menggunakan pelarut air kelapa dan pelarut akuades sebagai pembanding.

#### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu hasil pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

## **F. Definisi Operasional Variabel Penelitian**

- a. Media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan pelarut air kelapa dan akuades adalah media agar darah yang dibuat menggunakan pelarut air kelapa tua dan pelarut akuades dengan ditambah darah domba 5-10%, skala variabel nominal.
- b. Hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah hasil pertumbuhan koloni yang diamati karakteristik morfologi koloni dan diukur lebar diameter koloni menggunakan jangka sorong, skala variabel rasio dalam satuan mm.

## **G. Batas Istilah**

### **1. Media *Blood Agar Plate***

Media BAP merupakan media pertumbuhan bakteri yang terbuat dari media agar dengan ditambahkan darah domba sebagai sumber nutrisi pertumbuhan bakteri. Media BAP dibuat sesuai standar laboratorium.

### **2. Pelarut air kelapa tua**

Pelarut air kelapa tua yaitu air kelapa yang berasal dari dalam kelapa dan berusia tua dengan ciri-ciri daging kelapa putih keras, memiliki batok kelapa coklat kehitaman, dan tidak tumbuh tunas. Air kelapa dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf kemudian digunakan sebagai pelarut media BAP.

### 3. Pelarut akuades

Pelarut akuades merupakan air murni yang mengandung H<sub>2</sub>O dan bersifat netral. Akuades dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf kemudian digunakan sebagai pelarut pada media BAP.

### 4. Hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*

Hasil pertumbuhan koloni bakteri yaitu diamati morfologi koloni bakteri dan diukur diameter koloni menggunakan jangka sorong. Koloni berwarna putih abu-abu dan dikelilingi zona hemolisis beta.

## H. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

### 1. Jenis data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan data primer. Data diperoleh secara langsung dengan dilakukan pengamatan oleh peneliti di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

### 2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang dilakukan yaitu pengamatan langsung secara makroskopik dan mikroskopik terhadap morfologi koloni dan sel bakteri dengan pengukuran diameter koloni dan zona hemolisis bakteri serta pengamatan pada mikroskop. Dihasilkan perbedaan penggunaan larutan air kelapa dan aquades pada media agar darah terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

## I. Instrumen dan Bahan Penelitian

### 1. Instrumen penelitian

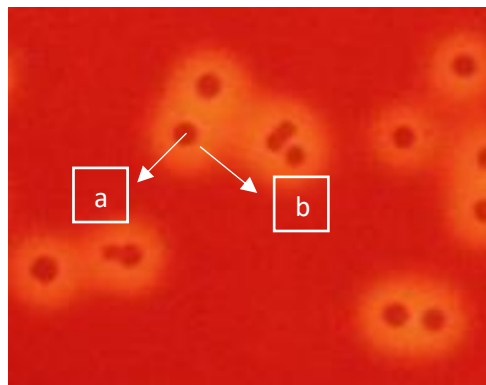
- |                                          |                        |
|------------------------------------------|------------------------|
| a. Oven                                  | i. Labu Erlenmeyer     |
| b. Autoklaf                              | j. Pipet ukur          |
| c. Inkubator                             | k. Ose bulat           |
| d. Mikroskop                             | l. Bunsen              |
| e. Neraca                                | m. Kapas               |
| f. Tabung reaksi                         | n. <i>Object glass</i> |
| g. Rak tabung reaksi                     | o. Jangka sorong       |
| h. <i>Disposable plate</i> (cawan petri) | p. Spidol              |

### 2. Bahan penelitian

- a. Biakan murni *Streptococcus pyogenes*
- b. Air kelapa tua
- c. Akuades
- d. Media *Blood Agar Base* (BAB)
- e. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- f. Darah domba
- g. Hidrogen peroksida
- h. NaCl isotonis
- i. Cat gram

## J. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas pada penelitian ini dilakukan pengukuran pertumbuhan bakteri pada diameter koloni bakteri menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan untuk mengetahui diameter zona hemolisis dan diameter koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Uji reabilitas dilakukan dengan pengukuran diameter koloni dan zona hemolisis secara berulang selama 30 kali pada media BAP aquades dan media BAP air kelapa. Jumlah perhitungan pada media sebanyak 60 media BAP.



Gambar 8. Makroskopis Morfologi Koloni Bakteri dan Zona Hemolisis  
Bakteri *Streptococcus pyogenes*  
Keterangan: (a) Koloni Bakteri (b) Zona Hemolisis

Sumber : Hossain Z., 2014.

## K. Prosedur Penelitian

### 1. Tahap persiapan

#### a. Etik penelitian

Peneliti mengajukan surat etik penelitian di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

b. Perizinan

Peneliti mengajukan surat perizinan penelitian kepada pengelola untuk menggunakan Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

c. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan tujuan menghindari kontaminasi bakteri pengganggu untuk pertumbuhan bakteri uji.

Prosedur sterilisasi alat dapat dilakukan dengan cara :

- 1) Mencuci semua peralatan yang akan dilakukan seperti: tabung reaksi, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet ukur dan ose bulat.
- 2) Semua peralatan yang telah dicuci dikeringkan dan dibungkus kertas dengan diberi keterangan pada bungkusannya.
- 3) Dilakukan sterilisasi alat menggunakan oven dalam suhu  $110^{\circ}\text{C}$  selama 12-24 jam.

d. Persiapan air kelapa

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan air kelapa tua yang dibeli dari penjual kelapa dengan ciri-ciri daging kelapa putih keras, memiliki batok kelapa coklat kehitaman, dan tidak tumbuh tunas. Air kelapa disaring menggunakan kertas saring supaya terpisah dari kotoran.

e. Persiapan bakteri *Streptococcus pyogenes*

Bahan uji bakteri pada penelitian ini yaitu isolat murni bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

2. Tahap pelaksanaan

a. Pembuatan media BAP air kelapa

- 1) Menimbang bahan baku BAP sebanyak 24 gram, kemudian memasukkan kedalam erlenmeyer.
- 2) Menambahkan air kelapa sebanyak 600 ml dan melarutkan hingga homogen.
- 3) Kemudian menutup erlenmeyer dengan kapas dan dikemas menggunakan plastik untuk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 90 menit.
- 4) Menunggu hingga suhu turun dan mengeluarkan sisa-sisa uap dan air. Media dibiarkan hingga hangat kira-kira suhu 50°C.
- 5) Menambahkan darah domba suhu kamar sebanyak 5-10% (30-60 ml/400 ml media) kemudian mencampurkan hingga homogen.
- 6) Menuangkan kedalam cawan petri steril secara aseptik kurang lebih sebanyak 20 ml per cawan. Menunggu hingga media memadat.
- 7) Membungkus media yang sudah memadat dengan kertas secara terbalik agar uap air hasil kondensasi tidak mengenai media.

b. Pembuatan media *Blood Agar Plate* aquades

- 1) Menimbang bahan baku Blood Agar Plate sebanyak 24 gram, kemudian memasukkan kedalam erlenmeyer.
- 2) Menambahkan akuades sebanyak 600 ml dan melarutkan hingga homogen.
- 3) Kemudian menutup erlenmeyer dengan kapas dan dikemas menggunakan plastik untuk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit.
- 4) Menunggu hingga 15 menit hingga suhu turun dan mengeluarkan sisa-sisa uap dan air. Media dibiarkan hingga hangat kira-kira suhu 50°C.
- 5) Menambahkan darah domba suhu kamar sebanyak 5-10% (30-60 ml/400 ml media) kemudian mencampurkan hingga homogen.
- 6) Menuangkan kedalam cawan petri steril secara aseptik kurang lebih sebanyak 20 ml per cawan. Menunggu hingga media memadat.
- 7) Membungkus media yang sudah memadat dengan kertas secara terbalik agar uap air hasil kondensasi tidak mengenai media.

c. Persiapan bakteri uji

- 1) Isolate murni *Streptococcus pyogenes* ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 2) Bakteri dari media BHI ditanam pada media BAP kemudian identifikasi yaitu koloni memiliki ciri-ciri berwarna putih abu-abu, bulat, sedikit cembung dan dikelilingi zona hemolisis beta. Dilakukan

uji pewarnaan gram (bakteri berwarna ungu menandakan gram positif dan berbentuk bulat dengan pola berderet), uji katalase (negatif, tidak terbentuk buih).

d. Inokulasi bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP air kelapa dan BAP aquades

1. Diambil suspensi bakteri dari media BHI menggunakan ose bulat.
2. Letakkan suspensi bakteri pada satu titik diujung *plate* kemudian ratakan dengan cara di gores menggunakan ose.
3. Teknik penggoresan dilakukan menggunakan teknik goresan kuadran atau radial.
4. Tutup media BAP kemudian inkubasi selama 48 jam dalam suhu 37°C.
5. Inokulasi dilakukan sebanyak 30 kali pada media BAP air kelapa dan BAP aquades.

e. Pengamatan hasil

- e. Dilakukan pengamatan hasil secara makroskopis pada morfologi koloni bakteri, seperti warna, bentuk, tepian koloni dalam menghemolisis media.
- f. Dilakukan pengukuran diameter koloni menggunakan jangka sorong digital dengan satuan milimeter (mm). Koloni yang dipilih yaitu koloni tunggal terbesar pada tiap *plate*.

## L. Manajemen Data

### 1. Penyajian data

Data yang telah terkumpul disajikan dalam bentuk tabel dan diagram batang. Setelah dibuat sajian data, selanjutnya data dianalisis menggunakan teknik analisis deskriptif dan analisis statistik. Hasil pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP air kelapa dan akuades dengan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis.

### 2. Analisis Deskriptif

Pada penelitian ini analisis deskriptif yaitu hasil dari pengamatan dan pengukuran bakteri secara makroskopis pada morfologi koloni dan dengan mengukur diameter koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP menggunakan pelarut air kelapa dan pelarut akuades. Data yang telah diperoleh merupakan hasil pengamatan koloni, pengukuran diameter koloni dan zona hemolisis bakteri *Streptococcus pyogenes*. Data yang diperoleh kemudian dihitung nilai rerata dan selisih rerata.

### 3. Analisis statistik

Data yang didapatkan merupakan hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada BAP air kelapa dan 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:

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

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

Data yang berdistribusi normal diuji statistik *Independent Sampel T Test* untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media BAP air kelapa dan BAP aquades. Sedangkan data yang berdistribusi tidak normal diuji statistik *Mann Whitney U (2 Independent Samples)*. Hipotesis statistik sebagai dasar pengambilan keputusan adalah :

$H_0$  : Tidak ada perbedaan jika Sig. > 0,05 hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan *Blood Agar Plate* (BAP) aquades.

$H_a$  : Ada perbedaan jika Sig. < 0,05 hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) air kelapa dan *Blood Agar Plate* (BAP) aquades.

#### **M. Etika Penelitian**

1. Peneliti telah mendapatkan Surat Etik Penelitian di Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta yang dinyatakan layak etik sesuai 7 standar WHO dengan nomor layar etik No.DP.04.03/e-KEPK.1/552/2025.
2. Pada penelitian ini mengalami beberapa hambatan diantaranya waktu pengajuan surat etik di KEPK memerlukan waktu yang cukup lama dan pengadaan bahan uji penelitian memerlukan waktu pemesanan hingga bahan uji tersedia.