

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Media Pertumbuhan Bakteri

Media digunakan untuk tempat pertumbuhan bakteri di laboratorium mikrobiologi. Media kultur terdiri atas campuran nutrisi yang nantinya digunakan untuk bakteri berkembang biak (Atmanto *et al.*, 2022).

Berikut beberapa jenis media:

a. Media Selektif

Media selektif merupakan media pertumbuhan bakteri yang digunakan hanya untuk menumbuhkan bakteri tertentu, membuat bakteri tertentu berkembang pesat sedangkan jenis mikroba lain menjadi terhambat. Bahan yang digunakan dapat berupa antibiotik, garam atau bahan kimia lainnya. Contoh media *MacConkey*.

b. Media Diferensial

Media diferensial merupakan media yang apabila ditumbuhi dengan bakteri yang berbeda maka akan menunjukkan ciri khusus biasanya ditandai dengan perubahan pH atau indikator warna. Media diferensial sudah ditambahkan dengan reagensia khusus tertentu sehingga bakteri yang tumbuh dapat menunjukkan perubahan spesifik sehingga dapat dibedakan dengan aslinya.

c. Media diperkaya

Media diperkaya (*enrichment*) merupakan media pertumbuhan mikroorganisme yang memang ditambahkan suatu nutrisi untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri tertentu. Bahan-bernutrisi antara lain seperti darah, serum atau ekstrak khamir. Seperti misalkan media agar darah dengan darah yang digunakan untuk kultivasi mikroorganisme selektif seperti *Streptococcus spp.* serta untuk melihat zona hemolisis.

2. Media Agar Darah

Media agar darah merupakan media kultur diperkaya (*enriched*) dan diferensial yang digunakan secara rutin dalam mikrobiologi klinis untuk isolasi bakteri *fastidious* (sukar tumbuh) serta mendeteksi aktivitas hemolisis.

a. *Blood Agar Base*

Media *Blood Agar Base* (BAB) diformulasikan sebagai media basal yang kaya nutrisi namun belum mengandung sel darah. Struktur fisik dan nutrisi dasar media disediakan oleh *Blood Agar Base*. Komposisi utamanya meliputi *peptone* atau *tryptone* yang menyediakan asam amino esensial dan nitrogen yang dibutuhkan untuk sintesis protein bakteri (dinding sel), garam (NaCl) sebagai penyeimbang osmotik dan agar sebagai agen pemat media. Media ini dikategorikan sebagai media *enrichment* (diperkaya) setelah ditambahkan darah, karena kemampuannya menunjang

pertumbuhan mikroorganisme *fastidious* (sukar tumbuh) yang tidak dapat mensintesis nutrisi kompleksnya sendiri (Bonnet *et al.*, 2019).

b. Darah Domba

Media agar darah domba merupakan media standar salah satunya sebagai media pertumbuhan untuk mengidentifikasi bakteri patogen. Umumnya media agar darah domba dibuat dengan konsentrasi 5%-10%, rekomendasi untuk penggunaan rutin di laboratorium mikrobiologi klinis di seluruh dunia. Darah domba yang digunakan telah mengalami proses defibrinasi yakni dengan melalui proses pembuangan fibrin dari dalam darah dengan pengendapan kimia (Krihariyani, 2016; Niederstebruch *et al.*, 2017).

Eritrosit domba memiliki dinding sel yang stabil namun mudah dilisiskan oleh enzim bakteri, menghasilkan zona hemolisis beta yang sangat jernih dan kontras. Secara teoritis, darah domba defibrinasi dianggap sebagai standar emas (*gold standard*) bukan hanya karena ketersediaannya, tetapi karena eritrosit domba tidak mengandung antibodi alami atau faktor inhibitor yang dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri dan tidak memiliki reseptor antibodi yang dapat bereaksi silang dengan bakteri patogen manusia (Carroll *et al.*, 2015; Putri *et al.*, 2024).

Selain itu, dinding sel eritrosit domba memiliki sensitivitas tinggi terhadap toksin hemolisin yang dihasilkan *Streptococcus*, sehingga zona bening (beta) dan mudah diukur dibandingkan darah

hewan lain atau manusia. Darah domba mengandung eritrosit, lemak, protein, glukosa, asam amino, natrium, kalium, magnesium fosfat mangan, tembaga dan yodium. Darah domba dewasa umumnya mengandung 9,0–11,1 eritrosit; 11,6–13,0 hemoglobin dan 32,2–37,0 hematokrit. (Djannatun *et al.*, 2008; Turista and Puspitasari, 2019).

c. *Packed Red Cell*

Packed Red Cell (PRC) merupakan komponen darah yang telah dipisahkan dari plasma biasa disebut sel darah pekat karena didominasi oleh eritrosit. Komposisi berupa eritrosit, hemoglobin, lemak, protein, enzim, zat besi, urea, asam amino, vitamin, amilase dan fosfat. Komponen darah ini mengandung kadar hemoglobin yang lebih tinggi dengan kadar 60-70% dibandingkan dengan darah utuh atau *whole blood*. Konsentrasi hemoglobin tiap unit PRC 150-200 ml mempunyai hemoglobin dalam PRC berkisar 20 g/100 ml dengan hematokrit 55-75% (Ajmani, 2020; Sepvianti *et al.*, 2022).

Penyimpanan PRC pada suhu 2-6° C dengan masa simpan selama $\pm$ 35 hari tergantung pada jenis koagulannya menurut *American Association of Blood Bank* (Carson *et al.*, 2023). Penyimpanan darah pada suhu tersebut bertujuan untuk menjaga agar *dextrose* tidak cepat habis dan mengurangi pertumbuhan bakteri yang dapat mengontaminasi. Setelah melewati masa simpan, PRC sudah tidak layak untuk kebutuhan transfusi. Secara fisik, darah

yang disimpan dalam jangka waktu lama akan mengalami perubahan alami pada integritas dinding selnya. Dinding sel eritrosit menjadi lebih rapuh (*fragile*) dan sebagian sel mengalami pecah (lisis) secara spontan. Membran sel mengalami degradasi yakni membran menjadi lebih permeabel (mudah ditembus) dan rapuh, sehingga nutrisi intraseluler seperti pelepasan hemoglobin dan zat besi (*Iron*) lebih mudah diakses oleh bakteri dibandingkan pada eritrosit segar yang membrannya masih kokoh (Vani *et al.*, 2015).

Kantong PRC mengandung antikoagulan CPDA-1 memiliki masa simpan 35 hari. Darah dinyatakan kedaluwarsa setelah melewati hari ke-35. Beberapa studi literatur menunjukkan bahwa darah manusia kedaluwarsa masih dapat mendukung pertumbuhan bakteri hingga 30 hari pasca-kedaluwarsa (*expired date*), meskipun terjadi penurunan kadar glukosa dan peningkatan fragilitas osmotik eritrosit (Russell *et al.*, 2021; Amer *et al.*, 2020).

d. Peran Suplementasi Darah

Penambahan darah mamalia sebanyak 5-10% ke dalam media basis agar yang telah disterilkan bertujuan untuk menyuplai faktor pertumbuhan mikro yang tidak disediakan oleh media basis seperti faktor X (hemin) dan eritrosit utuh dalam media sebagai substrat indikator melihat produk enzim hemolisin oleh bakteri patogen dan kemampuan bakteri menyebabkan penyakit (*virulensi*) di dalam tubuh inang. (Patel and Naik, 2021).

e. Pengaruh Suhu terhadap Eritrosit dalam Pembuatan Media

Pembuatan media agar darah, kontrol suhu saat pencampuran darah dengan basis agar merupakan faktor kritis. Darah mamalia (baik darah domba maupun PRC) hanya boleh ditambahkan ketika basis agar telah didinginkan hingga mencapai suhu stabil 45–50°C. Apabila darah ditambahkan pada saat suhu basis agar masih terlalu tinggi (>50–60°C), akan terjadi lisis termal pada membran eritrosit. Pecahnya eritrosit ini menyebabkan pelepasan hemoglobin dan nutrisi intraseluler lainnya (seperti Faktor X/hemin dan Faktor V/NAD) ke dalam media (Tille, 2021).

Proses penambahan darah (defibrinasi atau PRC) ke dalam basis agar harus dilakukan pada rentang suhu kritis 45°C hingga 50°C. Rentang suhu ini dipilih karena jika suhu >50°C akan menyebabkan hemolisis sel darah merah dan denaturasi protein (terbentuk agar coklat), sedangkan jika suhu <45°C media agar akan mulai memadat (*gelling*) sehingga darah tidak tercampur homogen (gumpalan) (Cappuccino and Welsh, 2019).

Pemanasan ini kemudian mendenaturasi protein hemoglobin, mengubah warnanya dari merah cerah menjadi coklat tua, yang dikenal sebagai Media Agar Coklat (*Chocolate Agar*) (Riedel *et al.*, 2019). Meskipun Agar Coklat sangat baik untuk menumbuhkan bakteri rewel (*fastidious*) seperti *Haemophilus influenzae* atau *Neisseria gonorrhoeae*, kondisi ini merupakan

kegagalan dalam pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP) untuk tujuan uji hemolisis. Hal ini dikarenakan:

1) Hilangnya Eritrosit Utuh

Uji hemolisis *Streptococcus agalactiae* membutuhkan eritrosit yang masih utuh untuk dipecah oleh toksin bakteri (hemolisin). Jika eritrosit sudah pecah karena panas, zona bening (beta-hemolisis) tidak dapat terbentuk atau diamati.

2) Perubahan Visual

Warna latar belakang media yang coklat gelap akan mengaburkan pengamatan morfologi koloni dan tipe hemolisis (Tille, 2021).



Gambar 1. Media Agar Darah Coklat
Sumber: Riedel *et al.*, (2019)

3. Zona Hemolisis Bakteri

Hemolisis adalah proses terjadinya lisis atau pecahnya eritrosit sehingga menyebabkan hemoglobin dalam eritrosit terbebas. Tipe hemolisis dapat dibedakan menjadi tiga sebagai berikut.

a. Hemolisis Beta (β)

Hemolisis beta ditandai dengan adanya zona yang jernih dan bening total di sekitar koloni bakteri pada media agar darah. Kejernihan ini terjadi karena lisis atau pemecahan sel darah merah secara sempurna oleh enzim ekstraseluler yang disebut hemolisin, yang disekresikan oleh bakteri. Pola ini merupakan ciri khas dari patogen penting seperti *Streptococcus pyogenes* dan *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*) (Nurhidayanti, 2019).

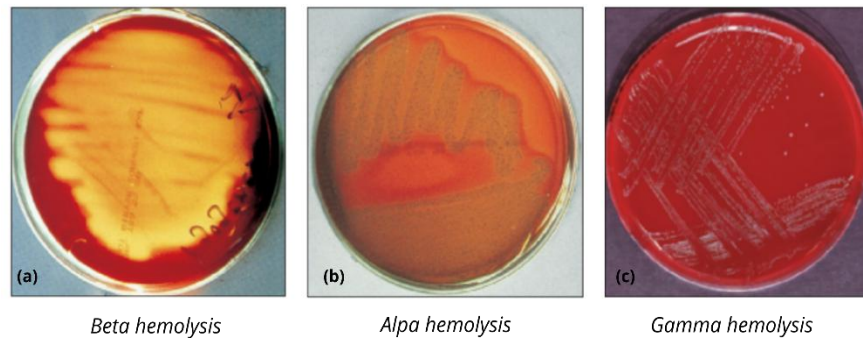
b. Hemolisis Alfa (α)

Hemolisis alfa terlihat sebagai zona berwarna kehijauan atau kecoklatan di sekitar koloni, yang mencerminkan lisis eritrosit yang parsial. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh oksidasi hemoglobin (pigmen merah dalam eritrosit) menjadi methemoglobin (pigmen berwarna hijau) melalui aktivitas hidrogen peroksida yang diproduksi bakteri. Pola hemolisis ini umum pada *Streptococcus pneumoniae* dan kelompok *viridans streptococci*. (Santin *et al.*, 2020).

c. Hemolisis Gamma (γ)

Hemolisis gamma mengindikasikan ketiadaan aktivitas hemolitik, ditandai dengan tidak adanya perubahan warna maupun zona lisis pada media agar darah. Bakteri yang menunjukkan pola ini tidak menyebabkan kerusakan eritrosit. Contoh organisme yang

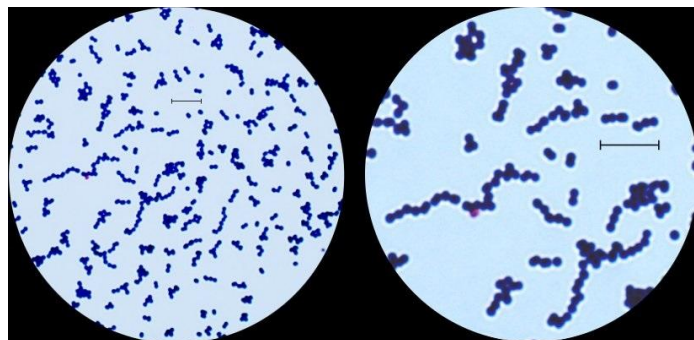
bersifat non-hemolitik adalah *Enterococcus faecalis* dan beberapa bakteri komensal lainnya (Niederstebruch *et al.*, 2017).



Gambar 2. Macam-Macam Zona Hemolisis
Sumber: Cappuccino and Welsh, (2019).

4. Bakteri *Streptococcus agalactiae*

a. Klasifikasi



Gambar 3. Gambaran mikroskopis *Streptococcus agalactiae*
Sumber : Riedel *et al.*, (2019).

Menurut Riedel *et al.*, (2019) dalam Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology*, *Streptococcus agalactiae* diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom : *Bacteria*
Fillum : *Bacillota*
Kelas : *Bacilli*

Ordo : *Lactobacillales*
 Famili : *Streptococcaceae*
 Genus : *Streptococcus*
 Spesies : *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*)

b. Karakteristik Bakteri

Bakteri *Streptococcus agalactiae* atau disebut Group B *Streptococcus* (GBS) adalah bakteri yang bersifat *fastidious*, artinya membutuhkan lingkungan tumbuh yang kaya nutrisi, khususnya sumber peptida dan hemin yang disediakan oleh media darah. Bakteri ini merupakan organisme anaerob fakultatif yang tumbuh optimal pada suhu 35–37°C dengan atau tanpa penambahan CO₂ (Shabayek dan Spellerberg, 2018). Kemampuan bakteri ini dalam melisis eritrosit menjadi parameter penting identifikasi, yang dipengaruhi oleh produksi (Armistead *et al.*, 2019).

a. Morfologi Sel (Mikroskopis)

Berdasarkan pengamatan mikroskopis (seperti pada Gambar 2). *Streptococcus agalactiae* memiliki ciri dinding sel yang tebal sehingga menahan zat warna kristal violet pada pewarnaan Gram.

- (1) Sifat Gram: Gram-Positif (berwarna ungu atau biru tua).
- (2) Bentuk Sel: Kokus (bulat) atau ovoid (bulat telur), berdiameter 0,6 – 1,2 µm.

- (3) Susunan: Sel-sel tersusun berderet membentuk rantai (*streptococci*). Panjang rantai bervariasi; pada sediaan langsung dari spesimen klinis rantai cenderung pendek (diplokokus atau rantai pendek), sedangkan pada kultur cair rantai tampak panjang.
- (4) Struktur: Tidak membentuk spora (*non-spore forming*) dan tidak memiliki alat gerak (*non-motile*). Beberapa galur virulen memiliki kapsul polisakarida yang terlihat jika dilakukan pewarnaan kapsul (Riedel *et al.*, 2019).

b. Morfologi Koloni (Makroskopis)

Pengamatan makroskopis dilakukan pada media Agar Darah setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Ciri khas koloni meliputi:

- (1) Ukuran: Koloni berukuran kecil hingga sedang (*punctiform*), dengan diameter berkisar 0,5 – 1 mm. Ukuran ini umumnya lebih besar dibandingkan koloni *Streptococcus pyogenes* (Grup A).
- (2) Warna dan Tekstur: Koloni berwarna putih keabu-abuan (*grayish-white*), permukaan rata atau sedikit cembung, dan tampak basah (*glistening*). Beberapa galur tampak *muroid* (berlendir) apabila memiliki kapsul yang tebal.

(3) Zona Hemolisis: *S. agalactiae* menghasilkan zona Beta-Hemolisis (zona bening total). Namun, ciri khas utamanya adalah zona hemolisis yang sempit (*narrow zone*) di sekeliling koloni, tidak selebar zona hemolisis pada *S. pyogenes*. Zona ini terkadang terlihat samar dan lebih jelas jika diamati dengan mengangkat cawan di bawah cahaya (transiluminasi). Sifat hemolisis ini muncul akibat aktivitas toksin *pore-forming* (beta-hemolisin) yang melisiskan eritrosit secara total (Tille, 2021; Procop *et al.*, 2017).



Gambar 4. Morfologi koloni *Streptococcus agalactiae* pada media agar darah domba.
Sumber: Tille, (2021)

c. Habitat

Bakteri *Streptococcus agalactiae* mempunyai habitat utama pada manusia yaitu saluran pencernaan bagian bawah (usus) dan saluran genitourinari (vagina dan uretra) (Shabayek and Spellerberg, 2018). Diperkirakan sekitar 18% hingga 30% populasi orang dewasa sehat di seluruh dunia menjadi pembawa (karier)

bakteri ini tanpa menunjukkan gejala (asimtomatik) (Seale *et al.*, 2017). Selain pada manusia, *S. agalactiae* juga merupakan salah satu patogen utama yang menyebabkan mastitis atau peradangan pada kelenjar susu sapi perah (Pribadi *et al.*, 2020; Windria *et al.*, 2022).

d. Patogenitas

Streptococcus agalactiae merupakan patogen yang sangat berbahaya bagi populasi rentan, terutama bayi baru lahir (neonatus). Bakteri ini menjadi penyebab utama infeksi neonatal invasif di seluruh dunia, yang dapat bermanifestasi sebagai sepsis (infeksi aliran darah), pneumonia (radang paru-paru), dan meningitis (radang selaput otak) (Seale *et al.*, 2017). Pada orang dewasa, infeksi GBS lebih sering terjadi pada individu dengan kondisi medis penyerta, seperti diabetes melitus, penyakit hati kronis, atau sistem kekebalan tubuh yang lemah (imunokompromais) (Shabayek and Spellerberg, 2018).

e. Kebutuhan Nutrisi *Fastidious*

Streptococcus agalactiae termasuk klasifikasi bakteri *fastidious* yang berarti biosintesis terbatas dan membutuhkan nutrisi kompleks dari inang atau media. Pertumbuhan optimalnya bergantung pada ketersediaan asam amino, peptida dan glukosa yang disuplai pada media basal serta faktor hemin yang disuplai oleh darah. Bakteri membutuhkan makanan atau nutrisi, dalam sel darah

merah terdapat zat besi (Fe) yang terikat pada hemoglobin. Zat besi adalah nutrisi super penting bagi bakteri untuk tumbuh dan membelah diri. (Raabe and Shane, 2019).

f. Mekanisme Beta-Hemolisis *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae memproduksi eksotoksin pembentuk pori (*pore-forming toxin*) yang disebut β -hemolisin atau sitolisin. Toksin ini bekerja dengan melubangi membran eritrosit secara total menyebabkan keluarnya hemoglobin dan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Kejelasan diameter zona hemolisis sangat dipengaruhi oleh kualitas membran eritrosit pada media, membran yang terlalu rapuh dapat memengaruhi visualisasi zona hemolisis (Armistead *et al.*, 2019).

5. Fase Pertumbuhan Bakteri

Menurut Mahjani and Putri (2020) Pertumbuhan bakteri mengikuti empat fase utama yang menggambarkan dinamika populasi mikroorganisme dalam media kultur:

1) *Lag phase* (Fase adaptasi)

Bakteri belum membelah, tetapi sedang beradaptasi dengan lingkungan baru. Aktivitas metabolik meningkat untuk mempersiapkan sintesis DNA dan enzim.

2) *Log phase* (Fase eksponensial)

Sel membelah secara aktif dan populasi meningkat secara eksponensial. Ini adalah fase optimal untuk studi metabolisme dan produksi enzim.

3) *Stasioner phase*

Nutrisi mulai habis dan produk limbah menumpuk. Laju kematian dan pembelahan sel menjadi seimbang.

4) *Decline phase* (Fase kematian)

Sel mulai mati karena kekurangan nutrisi dan akumulasi toksin.

6. Karakteristik Koloni Bakteri

a. Bentuk (*Shape*)

Bentuk koloni merupakan salah satu parameter dasar morfologi koloni, dapat mencerminkan pola pertumbuhan sel dan adaptasi terhadap media kultur. Bentuk umum meliputi *circular* (bulat, teratur), *spindel* (lonjong), *irregular* (tidak beraturan), *filamentous* (seperti benang).

b. Ukuran

Ukuran koloni dapat dinyatakan sebagai *punctiform* (titik sangat kecil), kecil, sedang dan besar, yang dapat digunakan sebagai laju pertumbuhan, efisiensi penggunaan nutrisi dan kompetisi antar sel atau koloni.

c. Pigmentasi

Pigmentasi berupa pengamatan warna koloni dapat bervariasi antara bakteri satu dengan yang lain bergantung pada jenis

bakteri dan pigmen yang diproduksi bakteri dapat berupa warna putih, kuning, hijau dan lain sebagainya.

d. Tepian (*Margin*)

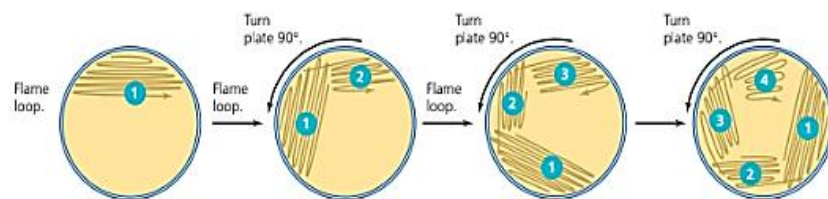
Tepian koloni bakteri dilihat dari batas koloni bakteri dapat berupa rata/halus, bergelombang, bergerigi.

e. Elevasi

Elevasi menggambarkan profil ketinggian koloni dari sisi samping dapat berupa datar, cembung, cekung.

7. Teknik Isolasi Biakan Bakteri

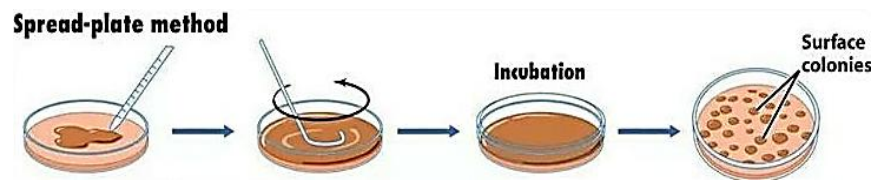
a. Teknik Cawan Gores (*Streak Plate Method*)



Gambar 5. Metode Cawan Gores
Sumber: Cappuccino and Welsh, (2019).

Metode cawan gores merupakan teknik isolasi bersifat kualitatif dan relatif cepat dilakukan. Pada metode ini dilakukan penyebaran biakan menggunakan satu ose penuh di atas permukaan media agar untuk mendapatkan koloni yang terpisah (Cappuccino and Welsh, 2019).

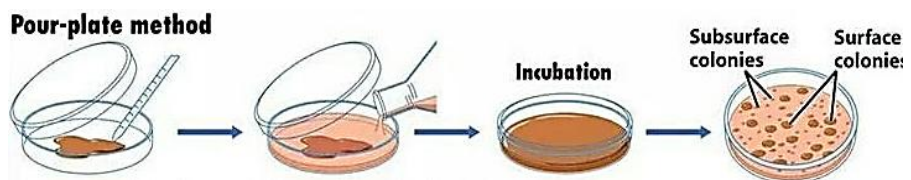
b. Teknik Cawan Sebar (*Spread Plate Method*)



Gambar 6. Metode Cawan Sebar
Sumber: Madigan *et al.*, (2021).

Metode cawan sebar dilakukan dengan menggunakan suspensi bakteri yang telah dilakukan pengenceran sebelumnya. Selanjutnya, suspensi bakteri tersebut disebarkan secara merata di permukaan media agar padat menggunakan ose bengkok steril berbentuk huruf “L” sambil memutar cawan petri selama proses inokulasi (A'yunin *et al.*, 2025).

c. Metode Cawan Tuang (*Pour Plate Method*)



Gambar 7. Metode Cawan Tuang
Sumber: Madigan *et al.*, (2021).

Metode cawan tuang dilakukan dengan bantuan ose atau mikropipet untuk membuat pengenceran berseri dari bakteri. Inokulum yang telah dilakukan pengenceran kemudian dituangkan ke dalam media agar yang masih cair di cawan petri, dicampur secara merata, dan dibiarkan hingga media mengeras (Terrones-Fernandez *et al.*, 2023).

8. Perhitungan Koloni Bakteri

Jumlah koloni merupakan parameter penting yang mencerminkan aktivitas serta kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan beradaptasi pada suatu media. (Madigan *et al.*, 2021). Prinsip metode *Viable Count* adalah menghitung koloni yang tumbuh dari sel hidup individu atau kelompok sel yang membentuk satu koloni (*Colony Forming Unit*, CFU). Jumlah koloni yang terhitung berada dalam kisaran 30–300 CFU per cawan dianggap valid untuk perhitungan karena memberikan keakuratan statistik yang optimal (Liu *et al.*, 2024).

Jumlah total bakteri dalam suatu suspensi diperoleh dengan mengalikan jumlah koloni yang terhitung pada lempeng dengan faktor pengenceran yang sesuai. Unit pembentuk koloni atau *Colony Forming Unit* adalah satuan dalam mikrobiologi untuk mengukur jumlah sel mikroorganisme yang viabel dalam suatu sampel baik media padat, metode *plating* dan perhitungan CFU merupakan standar emas untuk kuantifikasi sel viabel (masih hidup dan mampu berkembang biak) (Meyer *et al.*, 2023; Nai *et al.*, 2021). Perhitungan koloni beberapa ketentuan yang perlu diperhatikan yaitu:

- 1) Satu koloni dianggap mewakili satu sel atau satu unit (CFU)
- 2) Dua koloni yang bertumpuk dan tidak dapat dibedakan secara jelas dihitung satu koloni
- 3) Beberapa koloni yang menyatu dan membentuk massa juga dihitung sebagai satu koloni

- 4) Dua koloni yang berdekatan tetapi masih dapat dibedakan secara visual tetap dihitung sebagai dua koloni yang terpisah.

9. Perhitungan Uji Kualitas Media (Efektifitas)

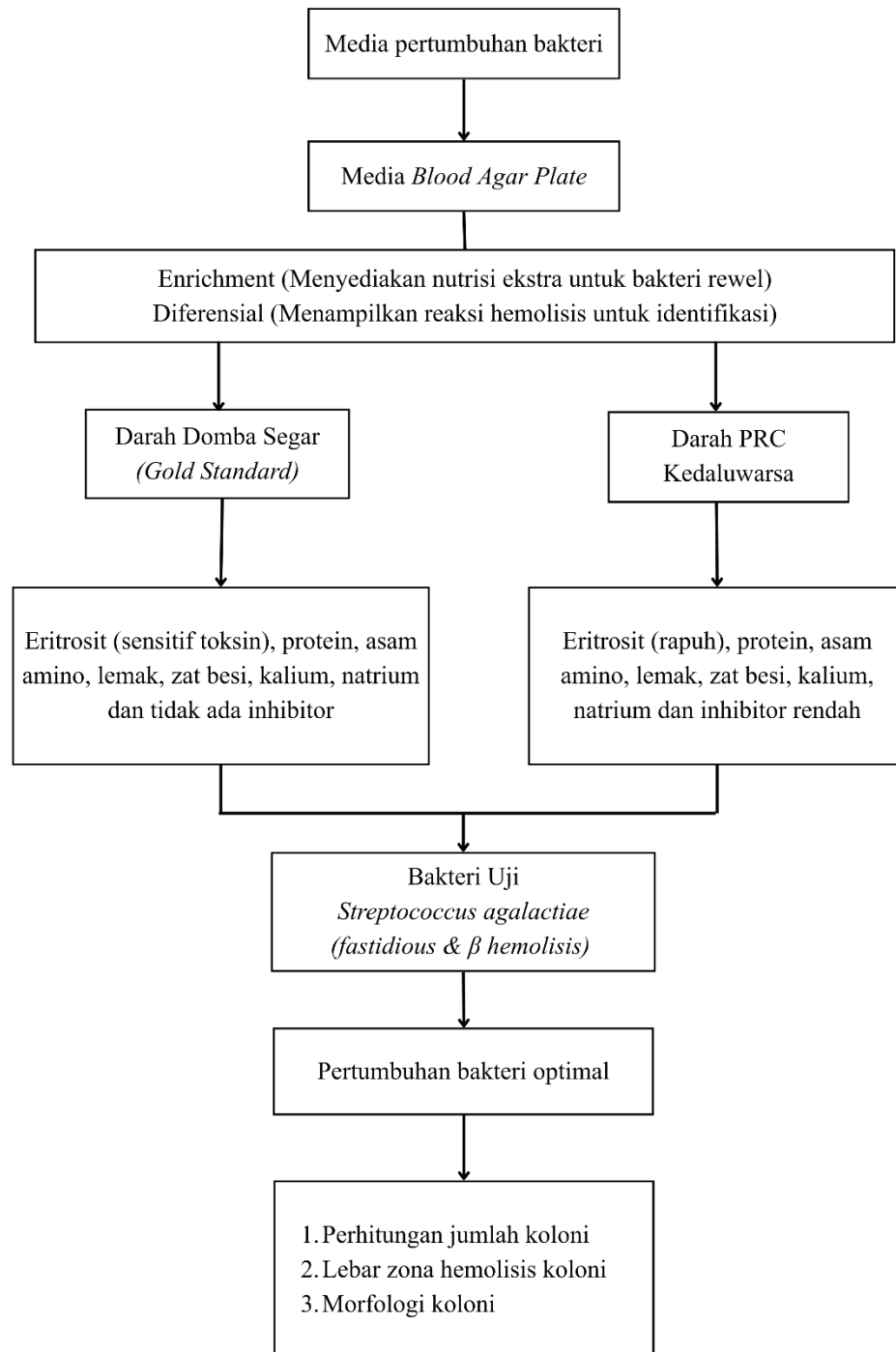
Kualitas media pertumbuhan bakteri sangat menentukan validitas hasil pemeriksaan mikrobiologi. Untuk menjamin bahwa media baru atau alternatif sebagai media uji (seperti media berbahan dasar PRC) mampu mendukung pertumbuhan bakteri target sama baiknya dengan media standar sebagai media referensi (darah domba), diperlukan pengujian performa media. Standar internasional yang digunakan sebagai acuan adalah ISO 1133:2014/Amd 2:2020.

Parameter utama dalam uji kualitas media padat non-selektif adalah Produktivitas (*Productivity*). Produktivitas didefinisikan sebagai rasio pemulihan (*recovery rate*) mikroorganisme pada media uji dibandingkan dengan media referensi (standar emas). Dalam metode kuantitatif, nilai ini dihitung sebagai Rasio Produktivitas (P_R).

$$P_R = \frac{\text{Jumlah Koloni pada Media Uji}}{\text{Jumlah Koloni pada Media Referensi}}$$

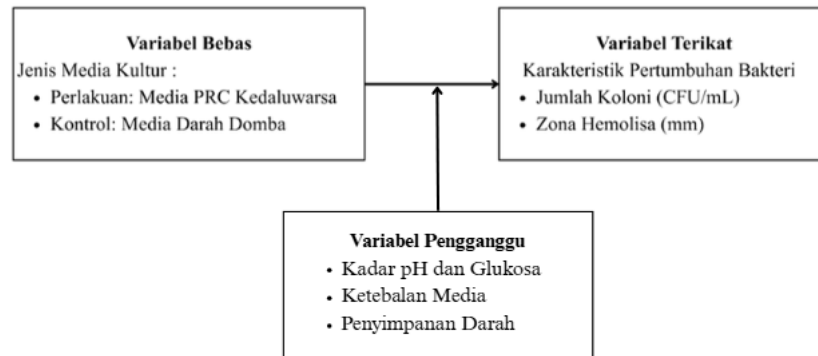
Berdasarkan kriteria ISO 11133:2020, sebuah media agar darah dianggap memiliki performa yang baik dan layak digunakan apabila memiliki nilai $P_R \geq 0,7$ (atau efektivitas $\geq 70\%$). Nilai di bawah 0,7 mengindikasikan bahwa media tersebut memiliki defisiensi nutrisi atau mengandung zat inhibitor yang menghambat pertumbuhan bakteri secara signifikan (ISO, 2020; Bonnet *et al.*, 2020).

B. Kerangka Teori



Gambar 8. Kerangka Teori Penelitian

C. Hubungan Antar Variabe



Gambar 9. Hubungan antar Variabel Penelitian

D. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori dan kerangka konsep yang telah diuraikan, hipotesis penelitian adalah

1. Media *Packed Red Cells* (PRC) kedaluwarsa mampu mendukung pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan jumlah koloni yang sebanding dengan media agar darah domba.
2. Media *Packed Red Cells* (PRC) kedaluwarsa mampu menghasilkan zona hemolisis *Streptococcus agalactiae* dengan diameter yang sebanding dengan media agar darah domba.