

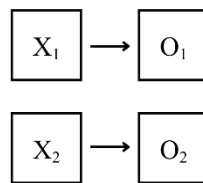
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan jenis kuasi-eksperimental karena melibatkan dua kelompok yang dibandingkan tanpa proses pemilihan sampel secara acak. Media *Blood Agar Plate* (BAP) darah kuda dan BAP domba tidak bisa diacak karena jenis medianya memang sudah berbeda dari awal. Menurut Sugiyono (2023), kuasi-eksperimen digunakan ketika peneliti ingin menguji efektivitas suatu perlakuan tetapi kondisi tidak memungkinkan kontrol penuh terhadap variabel luar.

Desain penelitian yang digunakan adalah *intact group comparison*, Menurut Sugiyono (2023), desain ini melakukan pengukuran setelah perlakuan diberikan (*posttest only*) tanpa *pretest*. Hal ini dikarenakan variabel respon berupa pertumbuhan *Staphylococcus aureus* baru muncul setelah proses inkubasi. Melalui desain ini, hasil pengamatan kemudian dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan karakteristik dan secara inferensial.



Gambar 10. Desain Penelitian

Keterangan:

X₁ = Penanaman *Staphylococcus aureus* pada media BAP kuda

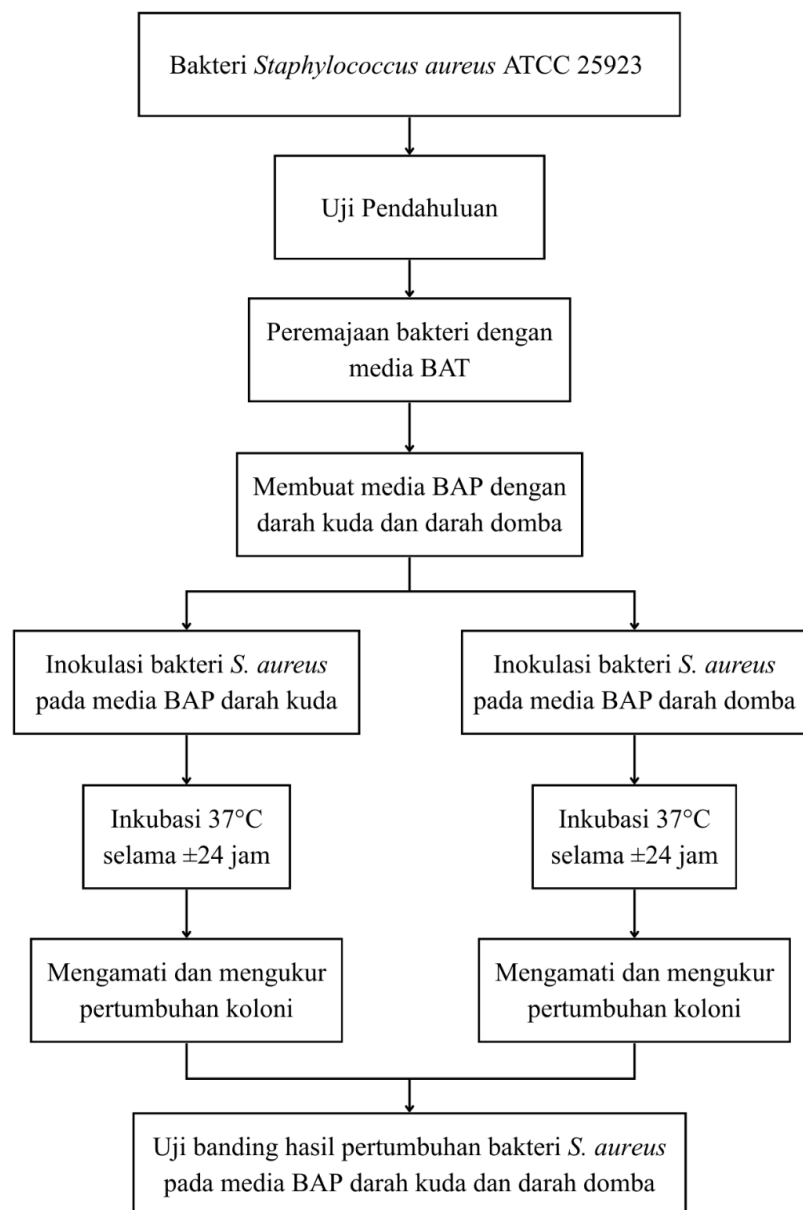
O₁ = Pengamatan hasil media BAP kuda

X₂ = Penanaman *Staphylococcus aureus* pada media BAP domba

O₂ = Pengamatan hasil media BAP domba

B. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Rancangan Percobaan

C. Subjek dan Objek

1. Subjek

Subjek dari penelitian ini adalah biakan murni dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Yogyakarta.

2. Objek

Objek penelitian ini adalah media BAP yang mengandung darah kuda 7,5%. Kuda yang digunakan adalah kuda Sandel (*Sandalwood horse*) memiliki berat ± 500 kg, sehat dan memiliki aktivitas ringan. Kuda ini berumur ± 5 tahun dan berada di daerah Srandakan, Bantul.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember - Januari 2025.

2. Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah jenis media BAP, yaitu darah kuda dan darah domba. Variabel ini dibedakan untuk melihat pengaruhnya terhadap pertumbuhan bakteri.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah hasil pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media BAP kuda dan domba.

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu penelitian ini adalah kontaminasi bakteri karena dapat mengganggu pembacaan hasil.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis media BAP yang digunakan yaitu BAP kuda dan BAP domba. Variabel ini dioperasionalkan dengan membedakan jenis darah yang ditambahkan ke dalam media. Perbedaan jenis darah tersebut digunakan untuk melihat pengaruhnya terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan demikian, jenis darah yang digunakan pada media BAP menjadi faktor utama yang secara sengaja dibedakan untuk mengamati efeknya pada pertumbuhan koloni bakteri.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada kedua jenis media BAP. Variabel ini dioperasionalkan melalui pengamatan/observasi setelah masa inkubasi selesai. Hal yang diamati meliputi morfologi koloni (makroskopis), morfologi sel (mikroskopis) dan diameter koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengukuran diameter koloni tunggal dilakukan menggunakan

jangka sorong digital dengan satuan milimeter (mm). Dengan cara ini, pertumbuhan bakteri dapat dinilai secara objektif.

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah kontaminasi bakteri, yaitu adanya pertumbuhan mikroorganisme lain selain *Staphylococcus aureus* pada media BAP yang dapat memengaruhi pengamatan dan pembacaan hasil. Kontaminasi dapat diidentifikasi apabila terdapat koloni dengan morfologi yang berbeda dan pertumbuhan tidak sesuai. Data kontaminasi dicatat dengan bentuk kategori “ada” atau “tidak ada”. *Plate* yang terkontaminasi tidak diikuti dalam analisis.

Terdapat beberapa faktor lain juga dapat memengaruhi hasil pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media BAP. Faktor tersebut mencakup:

- a. Faktor peremajaan
- b. Volume darah yang ditambahkan
- c. Konsentrasi inokulum
- d. Teknik isolasi
- e. Suhu dan waktu inkubasi
- f. Teknik pengukuran

Faktor-faktor tersebut juga perlu dikendalikan agar hasil pertumbuhan yang diperoleh benar-benar mencerminkan pengaruh jenis media BAP, bukan dipengaruhi variabel lain yang tidak diinginkan.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yaitu memperoleh data secara langsung oleh peneliti dengan melakukan pemeriksaan di laboratorium. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi/pengamatan langsung secara makroskopis dan mikroskopis. Data penelitian berupa karakteristik morfologi koloni (makroskopis), karakteristik morfologi sel (mikroskopis), pengukuran diameter koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan reratanya. Hal ini untuk melihat perbandingan pertumbuhan koloni bakteri di media BAP kuda dan domba. Masing-masing data diameter koloni yang dibutuhkan ialah 30 data per jenis media.

H. Alat Ukur dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a. Labu Erlenmeyer
 - b. Tabung reaksi
 - c. Gelas ukur
 - d. Kaca objek
 - e. Rak tabung reaksi
 - f. Ose
 - g. Bunsen
 - h. Korek
 - i. *Oven*
 - j. *Autoclave*
 - k. Inkubator

- l. Spektrofotometer
 - m. Mikroskop
 - n. Mikropipet
 - o. Kulkas
 - p. Neraca
 - q. *Ice box*
 - r. *Ice pack*
 - s. *Hot plate*
 - t. Rak pewarnaan
 - u. Jangka sorong *digital*
 - v. Spidol
 - w. Gunting
2. Bahan
- a. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus*
 - b. Darah kuda
 - c. Darah domba
 - d. *Blood bag* (antikoagulan: *citrate phosphate dextrose adenine* 35ml)
 - e. *Disposable plate*
 - f. *Blood agar base*
 - g. BaCl_2
 - h. H_2SO_4
 - i. Pewarna Gram (kristal violet, iodin, *alcohol* 95% dan safranin)
 - j. *Aquadest*

- k. Kapas
- l. Tip kuning
- m. Kertas
- n. Plastik
- o. Tali rafia
- p. *Parafilm*

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini menggunakan jangka sorong *digital* sebagai alat ukur untuk mengukur diameter koloni tunggal bakteri *Staphylococcus aureus* pada media BAP. Saat pengukuran, dapat dipastikan sudah sesuai dan tidak salah pembacaan karena jangka sorong sudah bersifat *digital*. Hasil pembacaan langsung muncul pada layar dalam satuan milimeter (mm). Sebelum penggunaan, dipastikan dulu skala baca dalam keadaan *zero* (0,0 mm). Jangka sorong *digital* dapat digunakan lebih dari satu kali dan tetap menghasilkan data yang konsisten.

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan oleh peneliti dengan pendampingan dan pengawasan Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) laboratorium mikrobiologi. Peneliti merupakan mahasiswa Poltekkes Kemenkes Yogyakarta program studi Sarjana Terapan semester VII yang telah menyelesaikan mata kuliah Bakteriologi dengan total 9 SKS mencakup teori dan praktik. Sebelum melaksanakan penelitian, peneliti telah konsultasi dengan dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping untuk

memastikan prosedur penelitian telah sesuai dengan kaidah yang berlaku. Proses penelitian juga dengan pengawasan PLP laboratorium mikrobiologi.

J. Prosedur Penelitian

1. Pengadaan Darah

a. Darah Kuda

- 1) Melakukan survei ke beberapa tempat yang memelihara kuda, baik secara konvensional maupun nonkonvensional.
- 2) Melakukan survei ke berbagai puskesmas hewan dan klinik hewan yang menyediakan jasa pengambilan darah hewan.
- 3) Mengajukan surat ijin dan *informed consent* kepada pemilik kuda untuk mengambil darah kudanya melalui vena jugularis
- 4) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 5) Melakukan sterilisasi Erlenmeyer menggunakan *oven* dengan suhu 80°C selama ± 24 jam.
- 6) Mengambil darah kuda oleh tenaga ahli menggunakan *blood bag*.
- 7) Memasukkan *blood bag* yang berisi darah kuda ke dalam *ice box* dan diberi *ice pack* untuk menjaga suhunya tetap dingin.
- 8) Membawa darah kuda ke laboratorium mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- 9) Menuangkan darah kuda ke dalam labu Erlenmeyer steril.

b. Darah Domba

- 1) Mengajukan permintaan darah domba ke pihak kampus Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 3) Melakukan sterilisasi Erlenmeyer menggunakan *oven* dengan suhu 80°C selama ± 24 jam.
- 4) Menuangkan darah domba ke dalam labu Erlenmeyer steril.

2. Pembuatan Media

a. Media *Blood Agar Plate* (BAP) Darah Kuda

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 2) Menimbang *blood agar base* sebanyak 16 gram menggunakan neraca.
- 3) Menuangkan *blood agar base* ke dalam labu Erlenmeyer.
- 4) Menambahkan *aquadest* sebanyak 400 ml ke *blood agar base* dalam labu Erlenmeyer, homogenkan.
- 5) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut dengan kapas, melapisi kapas tersebut dengan kertas dan plastik.
- 6) Mengikat area mulut labu Erlenmeyer dengan tali rafia agar tertutup rapat.
- 7) Memasukkan labu Erlenmeyer tersebut ke dalam *autoclave* dengan suhu 120 °C selama ± 90 menit.
- 8) Mengeluarkan labu Erlenmeyer dari *autoclave* dan menunggu *blood agar base* turun suhunya hingga hangat-hangat kuku (36,5°C – 40,5°C).

- 9) Menambahkan darah kuda sebanyak 5-10% (± 20 -40 ml/400 ml media) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi *blood agar base* steril, homogenkan.
- 10) Menuangkan *blood agar* pada *disposable plate* steril secara aseptik sebanyak ± 20 ml hingga menutupi permukaan cawan.
- 11) Menunggu media BAP hingga padat, kemudian dibungkus kertas dan disimpan dalam kulkas ± 24 jam.

b. Media *Blood Agar Plate* (BAP) Darah Domba

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 2) Menimbang *blood agar base* sebanyak 16 gram menggunakan neraca.
- 3) Menuangkan *blood agar base* ke dalam labu Erlenmeyer.
- 4) Menambahkan *aquadest* sebanyak 400 ml ke *blood agar base* dalam labu Erlenmeyer, homogenkan.
- 5) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut dengan kapas, melapisi kapas tersebut dengan kertas dan plastik.
- 6) Mengikat area mulut labu Erlenmeyer dengan tali rafia agar tertutup rapat.
- 7) Memasukkan labu Erlenmeyer tersebut ke dalam *autoclave* dengan suhu 120°C selama ± 90 menit.
- 8) Mengeluarkan labu Erlenmeyer dari *autoclave* dan menunggu *blood agar base* turun suhunya hingga hangat-hangat kuku ($36,5^{\circ}\text{C} - 40,5^{\circ}\text{C}$).

- 9) Menambahkan darah domba sebanyak 5-10% (± 20 -40 ml/400 ml media) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi *blood agar base* steril, homogenkan.
- 10) Menuangkan *blood agar* pada *disposable plate* steril secara aseptik sebanyak ± 20 ml hingga menutupi permukaan cawan.
- 11) Menunggu media BAP hingga padat, kemudian dibungkus kertas dan disimpan dalam kulkas ± 24 jam.

c. Media *Blood Agar* Tabung (BAT)

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 2) Melakukan sterilisasi tabung reaksi menggunakan *oven* dengan suhu 80°C selama ± 24 jam.
- 3) Menimbang *blood agar base* sebanyak 4 gram menggunakan neraca.
- 4) Menuangkan *blood agar base* ke dalam labu Erlenmeyer.
- 5) Menambahkan *aquadest* sebanyak 100 ml ke *blood agar base* dalam labu Erlenmeyer, homogenkan.
- 6) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut dengan kapas, melapisi kapas tersebut dengan kertas dan plastik.
- 7) Mengikat area mulut labu Erlenmeyer dengan tali rafia agar tertutup rapat.
- 8) Memasukkan labu Erlenmeyer tersebut ke dalam *autoclave* dengan suhu 120°C selama ± 90 menit.

- 9) Mengeluarkan labu Erlenmeyer dari *autoclave* dan menunggu *blood agar base* turun suhunya hingga hangat-hangat kuku ($36,5^{\circ}\text{C} - 40,5^{\circ}\text{C}$).
- 10) Menambahkan darah kuda/domba sebanyak 5-10% ($\pm 20-40$ ml/400 ml media) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi *blood agar base* steril, homogenkan.
- 11) Menuangkan *blood agar* pada tabung reaksi steril secara aseptik sebanyak ± 5 ml lalu ditutup dengan kapas.
- 12) Menunggu media BAT hingga padat dengan posisi tabung reaksi dimiringkan, kemudian disimpan dalam kulkas.

3. Persiapan Bakteri Uji

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Memperbanyak dan meremajakan isolat murni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media BAT.
- c. Melakukan inkubasi media BAT yang sudah ditanami bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama ± 24 jam.
- d. Mengidentifikasi koloni bakteri dari media BAT yang memiliki ciri morfologi koloni, morfologi sel dan sifat sesuai bakteri *Staphylococcus aureus*.

4. Pengenceran Bakteri Uji

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Menuangkan NaCl isotonik steril ke dalam tabung reaksi.

- c. Memanaskan ose di bunsen hingga berpijar.
 - d. Mengambil koloni bakteri pada media BAT kemudian masukkan ke tabung reaksi berisi NaCl, aduk sampai homogen atau rata.
 - e. Membandingkan kekeruhan pengenceran bakteri dengan larutan standar *McFarland* 0,5%.
5. Penanaman atau Inokulasi Bakteri Uji pada Media *Blood Agar Plate* (BAP)
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Memipet suspensi bakteri yang sudah diencerkan dengan NaCl sebanyak 50 μ L.
 - c. Meneteskan di permukaan media BAP bagian tepi.
 - d. Meratakan suspensi bakteri uji menggunakan ose.
 - e. Menarik garis dan membuat pola *streak plate* agar terbentuk koloni tunggal.
 - f. Melakukan penanaman ulang sebanyak 10 kali masing-masing pada media BAP kuda dan domba.
6. Inkubasi
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Memastikan inkubator sudah diatur dalam suhu 37°C.
 - c. Memasukkan semua media BAP yang sudah ditanami bakteri ke dalam inkubator dengan posisi agar di atas dan tutup di bawah.
 - d. Menutup inkubator hingga rapat dan tunggu selama 24 jam.

7. Pengamatan Hasil

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Mengamati karakteristik morfologi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media BAP secara makroskopis dan mikroskopis.
- c. Memilih 30 koloni tunggal pada media BAP kuda dan domba.
- d. Menghitung diameter koloni bakteri menggunakan jangka sorong *digital*.

K. Manajemen Data

1. Penyajian Data dan Analisis Deskriptif

Hasil penelitian berbentuk data primer dan dikumpulkan menjadi data yang terorganisir dengan baik dalam bentuk tabel dan diagram batang. Data yang disajikan merupakan hasil pengamatan media jadi, morfologi koloni (makroskopis), morfologi sel (mikroskopis) dan pengukuran diameter koloni tunggal serta reratanya. Penyajian data berupa gambar dokumentasi hasil diikuti dengan deskripsi secara umum, kemudian karakteristik morfologi dijabarkan dalam bentuk tabel.

Dari penelitian ini diperoleh 30 data individual hasil pengukuran diameter koloni yang berasal dari 15 kali pengulangan (15 *plate*). Masing-masing *plate* diambil 3 koloni sebagai unit pengamatan. Jadi, total data yang didapatkan nanti 90 data diameter koloni pada satu inkubasi. Rerata pengukuran diameter koloni disajikan dalam bentuk diagram batang. Kemudian, data dianalisis secara deskriptif, analitik dan statistik.

Analisis deskriptif dilakukan langsung berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media BAP kuda dan domba. Analisis deskriptif bertujuan untuk menjelaskan hasil pengamatan secara terperinci. Hal ini dilakukan agar perbandingan antara media BAP kuda dan domba terlihat jelas dan mudah dibaca.

2. Analisis Analitik

Analisis analitik menghitung selisih nilai rerata diameter koloni *Staphylococcus aureus* dan persentase efektivitas media. Perhitungan selisih rerata diameter digunakan untuk mengetahui seberapa besar perbedaan kemampuan masing-masing media dalam mendukung pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Peneliti mampu melihat secara jelas besarnya *gap* antara media BAP kuda dan domba.

Efektivitas berarti penilaian terhadap suatu tujuan atau hasil dari sebuah kegiatan. Semakin besar nilai efektivitas, maka semakin tinggi nilai keberhasilannya (Amelia, dkk., 2023). Pada Oktaviani dan Mulyandani (2022) dijelaskan bahwa kriteria efektivitas terbagi menjadi sebagai berikut:

Tabel 3. Kriteria Efektivitas

Persentase Pengukuran	Kriteria Efektivitas
> 100%	Sangat efektif
91% - 100%	Efektif
81% - 90%	Cukup efektif
61% - 80%	Kurang efektif
≤ 60%	Tidak efektif

Sumber: Oktaviani dan Mulyandani, 2022.

Persentase/tingkat efektivitas dihitung untuk mengetahui seberapa efektif darah kuda sebagai media BAP apabila dibandingkan dengan darah domba sebagai standar. Cara menghitung tingkat efektivitas ialah:

$$\text{Efektivitas (\%)} = \frac{X}{C} \times 100\%$$

Rumus 1. Efektivitas (%)

Keterangan:

X = Rerata diameter koloni pada media BAP kuda.

C = Rerata diameter koloni pada media BAP domba.

3. Analisis Statistik

Data hasil pengukuran diameter koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dianalisis untuk mengetahui perbandingan hasil pertumbuhan antara media BAP kuda dan domba. Data dianalisis menggunakan program SPSS versi 16.0 for windows. Sebelum dilakukan uji beda, data diuji normalitas (*Test of Normality*) untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak.

Hipotesis dalam pengambilan keputusan uji normalitas data adalah:

- a. H_0 : Data berdistribusi normal, apabila $Sig (Shapiro-Wilk) \geq 0,05$.
- b. H_a : Data tidak berdistribusi normal, apabila $Sig (Shapiro-Wilk) < 0,05$.

Setelah diketahui hasil uji normalitas, langkah selanjutnya adalah menentukan jenis uji statistik yang sesuai dengan sebaran data. Pemilihan uji statistik berdasarkan hasil nilai $Sig (Shapiro-Wilk)$. Jika data

berdistribusi normal, menggunakan uji statistik dengan *Independent Samples Test* untuk melihat perbedaan signifikan antara kedua kelompok. Jika data tidak berdistribusi normal, menggunakan uji *Mann-Whitney U* (2 *Independent Samples*). Hipotesis statistik yang digunakan sebagai dasar pengambilan keputusan ialah sebagai berikut:

- a. H_0 : Tidak ada perbedaan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media BAP kuda dan domba.
- b. H_a : Ada perbedaan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media BAP kuda dan domba.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan Surat Keterangan Layak Etik dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan nomor DP.04.03/e-KEPK.1/1342/2025. Pada penelitian ini diterapkan penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) lengkap, seperti masker, sarung tangan (*handscoon*), jas laboratorium dan sepatu tertutup. Hal tersebut untuk menjaga kesehatan dan keselamatan kerja (K3) di laboratorium mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.