

BAB III

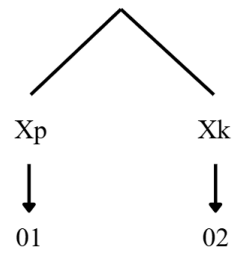
METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *quasi eksperimental* (eksperimen semu). Pendekatan ini dipilih karena peneliti tidak dapat mendapatkan kelompok kontrol yang mampu mengontrol variabel luar secara penuh. Eksperimen semu melibatkan setidaknya dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol tanpa randomisasi sampel karena kelompok sudah terbentuk sebelum penelitian dilakukan (Arib dkk., 2024). Kelompok eksperimen dalam penelitian ini yaitu media BAP darah kuda dan media BAP darah domba sebagai kelompok kontrol. Media BAP darah domba tidak dapat mengontrol variabel luar secara penuh seperti karakteristik darah hewan yang berbeda.

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *static-group comparison design* yang termasuk *non-equivalent posttest-only design*. Desain ini melibatkan dua kelompok yang tidak setara diberi perlakuan yang sama, kemudian dilakukan *post-test* tanpa adanya *pretest* (Kpolovie, 2016). Penelitian ini kedua kelompok diberi perlakuan sama dengan inokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*, kemudian dibandingkan untuk menilai efektivitas media. Desain penelitian tersebut disajikan pada Gambar 6.

Bakteri *Streptococcus pneumoniae*



Gambar 6. Desain Penelitian

Keterangan:

Xp = Eksperimen percobaan pada media BAP darah kuda

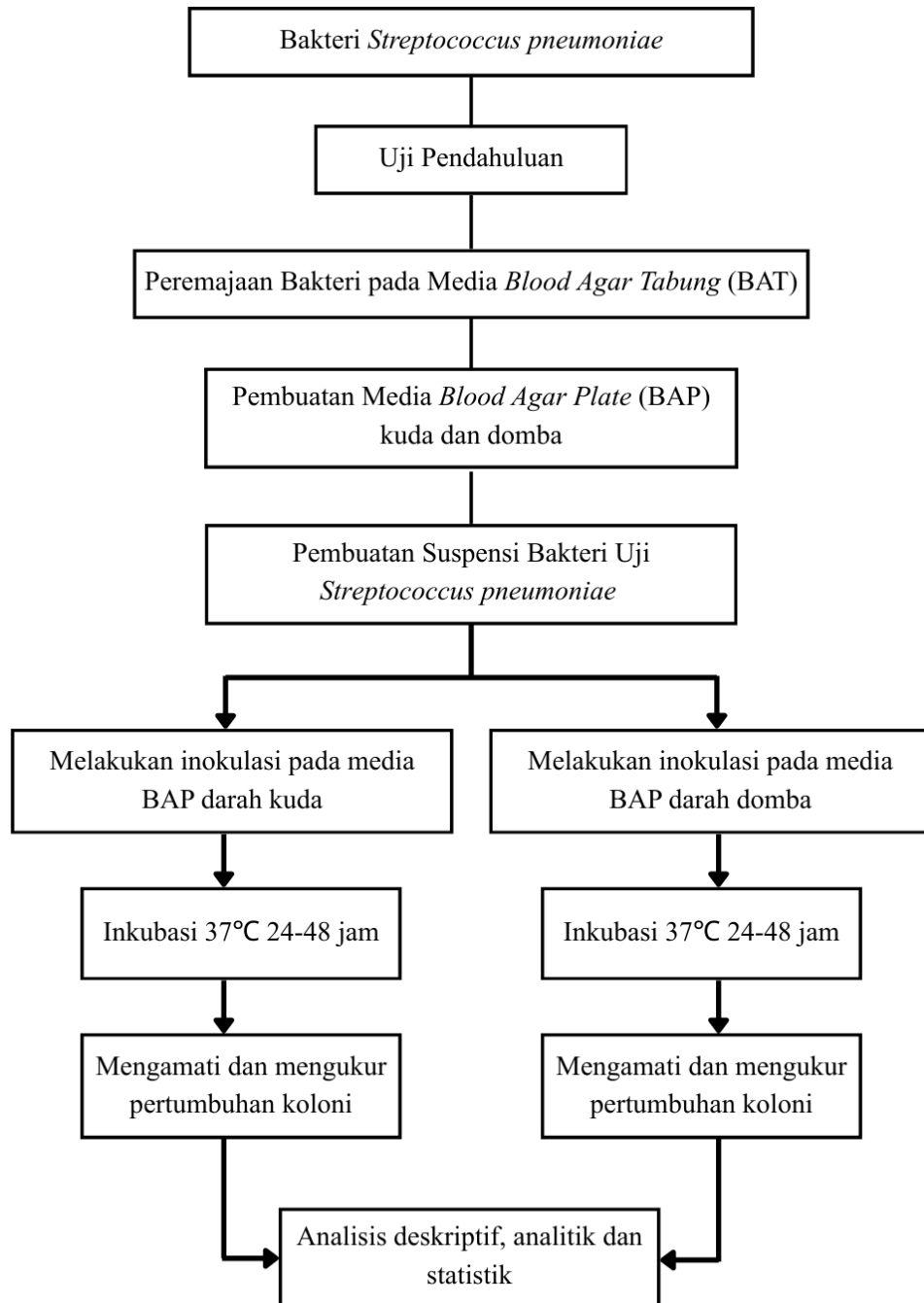
Xk = Eksperimen kontrol pada media BAP darah domba

01 = Hasil pertumbuhan koloni pada media BAP darah kuda

02 = Hasil pertumbuhan koloni pada media BAP darah domba

B. Alur Penelitian

Rancangan alur penelitian ini ditunjukkan pada Gambar



Gambar 7. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah biakan dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Yogyakarta.

2. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah media *Blood Agar Plate* (BAP) darah kuda. Media *Blood Agar Plate* (BAP) mengandung darah kuda 7,5 % (30 ml/400 ml media *blood agar base*). Jenis kuda yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jenis kuda Sandel (*Sandelwood horse*) dengan berat badan $\pm$ 500 kg yang dipastikan sehat dan rutin melakukan aktivitas ringan.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2026.

2. Tempat Penelitian

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

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah media agar darah kuda dan media agar darah domba.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah hasil pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

3. Variabel Pengganggu Terkendali

Variabel pengganggu terkendali penelitian ini adalah volume darah, ketebalan media, suhu inkubasi, waktu inkubasi, konsentrasi inokulum, teknik isolasi dan teknik pengukuran.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Media agar darah kuda dan agar darah domba adalah media yang digunakan sebagai media pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* dengan penambahan darah kuda atau darah domba 7,5 % (30 ml/400 ml media *blood agar base*). Jenis kedua media ini dikategorikan skala data nominal.

2. Variabel Terikat

Hasil pertumbuhan adalah gambaran pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda dan domba yang diukur secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pertumbuhan dan meliputi karakteristik morfologi koloni bakteri, morfologi sel dan ukuran diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda dan domba. Diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* memiliki satuan milimeter (mm) dikategorikan skala data rasio.

3. Variabel Pengganggu Terkendali

- a. Volume darah adalah jumlah darah kuda atau domba yang ditambahkan ke dalam media agar darah. Volume darah dikendalikan dengan cara menetapkan konsentrasi 7,5 % (30 ml/400 ml media *blood agar base*) pada seluruh media agar darah kuda dan domba.
- b. Ketebalan media adalah ukuran tinggi lapisan agar darah pada *disposable plate*. Ketebalan media dikendalikan dengan cara menuangkan volume media yang sama sekitar 3-4 mm atau 20 ml pada setiap *disposable plate*.
- c. Suhu inkubasi adalah suhu inkubator yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Suhu inkubasi dikendalikan dengan cara menginkubasi seluruh isolat pada suhu 37°C.
- d. Waktu inkubasi adalah lamanya waktu penyimpanan kultur dalam inkubator. Waktu inkubasi dikendalikan dengan cara menyamakan waktu inkubasi isolat selama 24 sampai 48 jam untuk semua sampel
- e. Konsentrasi inokulum adalah tingkat kepadatan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang digunakan. Konsentrasi inokulum dikendalikan dengan cara menyamakan tingkat kekeruhan dengan pembanding yaitu larutan Mcfarland 0,5%.

- f. Teknik isolasi adalah metode penanaman bakteri pada media. Teknik isolasi dikendalikan dengan teknik *streak plate* yang sama pada media agar darah kuda dan domba. Isolasi juga akan dilakukan secara aseptik untuk meminimalisir bakteri kontaminan.
- g. Teknik pengukuran adalah cara untuk mengukur pertumbuhan bakteri. Teknik pengukuran dikendalikan dengan mengukur koloni tunggal bakteri *Streptococcus pneumoniae* menggunakan cara dan alat yang sama dengan jangka sorong digital.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yaitu data yang diperoleh dari hasil pengamatan langsung oleh peneliti di laboratorium. Data penelitian berupa hasil media jadi, karakteristik morfologi koloni, morfologi sel, hasil pengukuran diameter koloni serta rerata diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda dan domba. Data pengukuran rerata diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* akan diambil dengan total 30 data.

H. Alat dan Bahan Penelitian

- 1. Alat
 - a. Labu Erlenmeyer
 - b. Tabung reaksi
 - c. Gelas ukur
 - d. Rak tabung reaksi
 - e. Ose

- f. Bunsen
 - g. Inkubator
 - h. *Oven*
 - i. Autoklaf
 - j. Kulkas
 - k. *Hot plate*
 - l. *Ice box*
 - m. *Ice pack*
 - n. Neraca
 - o. Mikropipet
 - p. Spektrofotometer
 - q. *Object glass*
 - r. Mikroskop
 - s. Jangka sorong digital
2. Bahan
- a. Biakan bakteri *Streptococcus pneumoniae*
 - b. *Blood agar base*
 - c. Darah domba
 - d. Darah kuda
 - e. Akuades
 - f. Alkohol
 - g. Larutan NaCl
 - h. BaCl_2

- i. H_2SO_4
- j. Pewarna Gram (kristal violet, iodine, alkohol 95% dan safranin)
- k. Minyak imersi
- l. *Disposable plate*
- m. *Blood bag* (antikoagulan: *citrate phosphate dextrose adenine* 35ml)
- n. Tip

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini menggunakan jangka sorong digital sebagai alat ukur. Jangka sorong digital yang digunakan memiliki satuan milimeter (mm) untuk mengukur ukuran diameter dan zona hemolisis koloni tunggal. Sebelum digunakan, jangka sorong digital selalu dilakukan penyetelan awal “zero” agar hasil pengukuran dimulai dari 0,0 mm. Jangka sorong digital dapat digunakan berulang kali dan tetap akan menghasilkan data yang konsisten.

Pengambilan data dilakukan oleh peneliti sendiri. Peneliti adalah mahasiswa Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Semester VII yang sudah lulus mata kuliah Bakteriologi teori dan praktik 9 SKS. Sebelum penelitian, peneliti telah beberapa kali melakukan konsultasi dengan dosen pembimbing utama dan pendamping sesuai dengan prosedur penelitian yang berlaku. Selama proses penelitian juga sudah sesuai dengan prosedur penelitian dibawah pengawasan Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) laboratorium

mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

J. Prosedur Penelitian

1. Pengadaan Darah

a. Darah Kuda

- 1) Melakukan survei ke beberapa tempat peternakan kuda baik konvensional maupun nonkonvensional.
- 2) Melakukan survei ke berbagai Puskesmas (Puskesmas Hewan) dan klinik hewan yang menyediakan jasa pengambilan darah hewan.
- 3) Mengirimkan surat ijin dan *informed consent* untuk menggunakan darah kuda sebagai objek penelitian.
- 4) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 5) Melakukan sterilisasi labu Erlenmeyer menggunakan oven pada suhu 80°C selama 24 jam.
- 6) Pengambilan darah kuda dilakukan oleh dokter hewan menggunakan *blood bag*. Satu *blood bag* darah kuda yang didapatkan dimasukkan ke dalam *ice box* yang berisi *ice pack* dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- 7) Menuangkan darah kuda yang didapatkan ke labu Erlenmeyer steril.

b. Darah Domba

- 1) Mengajukan permintaan pengambilan darah domba ke pihak kampus Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 3) Mensterilisasikan labu Erlenmeyer menggunakan oven pada suhu 80°C selama 24 jam.
- 4) Menuangkan darah domba yang didapatkan ke labu Erlenmeyer steril.

2. Pembuatan Media

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

- 1) Menimbang 16 gram bubuk *blood agar base* dengan neraca kemudian memasukkan ke dalam labu Erlenmeyer.
- 2) Melarutkan *blood agar base* dengan akuades 400 ml sampai homogen pada labu Erlenmeyer.
- 3) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut menggunakan kapas dan dilapisi kertas serta plastik dengan tali rafia hingga rapat.
- 4) Memasukkan labu Erlenmeyer yang berisi media *blood agar base* ke dalam bejana autoklaf pada suhu 120°C selama 90 menit.
- 5) Mengeluarkan labu Erlenmeyer yang berisi media *blood agar base* dari autoklaf kemudian menunggu suhu media *blood agar base* turun sampai hangat-hangat kuku (36,5°C).

- 6) Menambahkan darah kuda ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi media *blood agar base* sebanyak 7,5 % (30 ml/400 ml media *blood agar base*) kemudian mencampurkan hingga homogen.
 - 7) Menuangkan media *blood agar* ke dalam beberapa *disposable plate* steril secara aseptik sebanyak ± 20 ml setiap *disposable plate* steril.
 - 8) Menunggu media hingga padat kemudian membungkus dengan kertas dan memasukkan ke dalam kulkas selama ± 24 jam.
- b. Media *Blood Agar Plate* (BAP) Domba
- 1) Menimbang 16 gram bubuk *blood agar base* dengan neraca kemudian memasukkan ke dalam labu Erlenmeyer.
 - 2) Melarutkan *blood agar base* dengan akuades 400 ml sampai homogen pada labu Erlenmeyer.
 - 3) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut menggunakan kapas dan dilapisi kertas serta plastik dengan tali rafia hingga rapat.
 - 4) Memasukkan labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* ke dalam bejana autoklaf pada suhu 120°C selama 90 menit.
 - 5) Mengeluarkan labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* dari autoklaf kemudian menunggu suhu media *blood agar base* turun sampai hangat-hangat kuku (36,5°C).
 - 6) Menambahkan darah domba ke dalam labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* sebanyak 7,5 % (30 ml/400 ml media *blood agar base*) kemudian mencampurkan hingga homogen.

- 7) Menuangkan media *blood agar* ke dalam beberapa *disposable plate* steril secara aseptik sebanyak ± 20 ml setiap *disposable plate* steril.
- 8) Menunggu media hingga padat kemudian membungkus dengan kertas dan memasukkan ke dalam kulkas selama ± 24 jam.

c. Media *Blood Agar* Tabung (BAT)

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- 2) Mensterilisasikan tabung reaksi menggunakan oven pada suhu 80°C selama 24 jam.
- 3) Menimbang 4 gram bubuk *blood agar base* dengan neraca kemudian memasukkan ke dalam labu Erlenmeyer.
- 4) Melarutkan *blood agar base* dengan akuades 100 ml sampai homogen pada labu Erlenmeyer.
- 5) Menutup mulut labu Erlenmeyer tersebut menggunakan kapas dan dilapisi kertas dengan rapat.
- 6) Memasukkan labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* ke dalam bejana autoklaf pada suhu 120°C selama 90 menit.
- 7) Mengeluarkan labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* dari autoklaf kemudian menunggu suhu media *blood agar base* turun sampai hangat-hangat kuku ($36,5^{\circ}\text{C}$).
- 8) Menambahkan darah kuda/domba ke dalam labu Erlenmeyer berisi media *blood agar base* sebanyak 7,5 % (30 ml/400 ml)

media *blood agar base*) kemudian mencampurkan hingga homogen.

9) Menuangkan media *blood agar* ke dalam beberapa tabung reaksi steril secara aseptik sebanyak ± 5 ml setiap tabung reaksi steril kemudian menutup dengan kapas.

10) Menunggu media hingga padat dengan posisi tabung reaksi dimiringkan kemudian memasukkan ke dalam kulkas.

3. Persiapan Bakteri Uji

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- b. Memperbanyak dan meremajakan isolat murni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAT.
- c. Melakukan inkubasi media BAT tersebut menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- d. Mengidentifikasi koloni bakteri dari media BAT yang memiliki ciri morfologi dan sifat sesuai dengan bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

4. Pengenceran Bakteri Uji *Streptococcus pneumoniae*

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Melakukan sterilisasi tabung reaksi dan tip menggunakan oven pada suhu 80°C selama 24 jam.
- c. Memanaskan ose menggunakan api bunsen hingga berpijar.
- d. Mengambil koloni bakteri pada media BAT dengan ose.

- e. Melarutkan koloni bakteri dengan larutan NaCl 3 ml sampai homogen.
 - f. Membandingkan kekeruhan dengan larutan standar McFarland 0,5%.
5. Penanaman atau Inokulasi Bakteri Uji pada Media *Blood Agar Plate*
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Memanaskan ose menggunakan api bunsen hingga berpijar.
 - c. Mengambil suspensi bakteri sebanyak 50 µl menggunakan mikropipet.
 - d. Melakukan inokulasi pada media BAP kuda dan domba.
 - e. Melakukan penanaman ulang pada media BAP kuda dan domba masing-masing sebanyak 15 kali.
6. Inkubasi
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Memastikan suhu inkubator pada suhu 37°C.
 - c. Memasukkan semua media BAP kuda dan domba yang sudah ditanami bakteri uji ke dalam inkubator dengan posisi agar di atas dan tutup di bawah.
 - d. Menutup inkubator dengan rapat dan menginkubasi selama 24 sampai 48 jam.
7. Pewarnaan Gram
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Memanaskan ose menggunakan api bunsen hingga berpijar.

- c. Mengambil larutan NaCl dengan ose tersebut kemudian mengoleskan di atas *object glass*.
 - d. Memanaskan kembali ose menggunakan api bunsen hingga berpijar.
 - e. Mengambil koloni pada media BAP kuda dan domba kemudian mengoleskan di atas *object glass*.
 - f. Melakukan fiksasi *object glass* tersebut dengan melewati di atas api bunsen dalam posisi sedikit dimiringkan.
 - g. Meneteskan kristal violet pada preparat, mendiamkan selama 1 menit kemudian membilas dengan air mengalir.
 - h. Meneteskan iodium pada preparat, mendiamkan selama 1 menit kemudian membilas dengan air mengalir.
 - i. Meneteskan alkohol pada preparat, mendiamkan selama 30 detik kemudian membilas dengan air mengalir.
 - j. Meneteskan safranin pada preparat, mendiamkan selama 1 menit kemudian membilas dengan air mengalir.
 - k. Mengeringkan preparat dengan tisu atau udara kemudian mengamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan minyak imersi.
8. Pengamatan Hasil Pertumbuhan Bakteri
- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
 - b. Hasil inokulasi pada media *Blood Agar Plate* (BAP) kuda dan domba dipilih koloni tunggal bakteri *Streptococcus pneumoniae*.
 - c. Setiap koloni tunggal diukur diameter koloni menggunakan jangka sorong digital.

- d. Hasil pengamatan mikroskopis sel bakteri *Streptococcus pneumoniae* kemudian didokumentasi dan dideskripsikan.

K. Manajemen Data

1. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa hasil media jadi, karakteristik morfologi koloni, morfologi sel, hasil pengukuran diameter koloni serta rerata diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) darah kuda dan domba. Hasil pengamatan akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk gambar dokumentasi, tabel dan diagram sehingga dapat dibandingkan dengan jelas pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media BAP darah kuda dan darah domba. Data rerata ukuran diameter koloni bakteri didapatkan dari 15 kali pengulangan (15 *plate*) pada masing-masing media agar darah.

2. Analisis Analitik

Analisis analitik digunakan untuk menghitung persentase keefektifan media agar darah kuda. Data pengukuran rerata diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* digunakan untuk mengetahui persentase efektivitas kemudian dilakukan interpretasi terhadap kriteria tingkat efektivitas media agar darah kuda dibandingkan dengan agar darah domba. Kriteria efektivitas ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria Efektivitas

Persentase Rasio Efektivitas	Kriteria Rasio Efektivitas
Lebih dari 100%	Sangat efektif
90-100%	Efektif
80-90%	Cukup efektif
60-80%	Kurang efektif
Kurang dari 60%	Tidak efektif

Sumber: Utama, Fatona dan Sudiyarti, 2022.

Persentase efektivitas dihitung untuk mengetahui efektivitas media agar darah kuda dibandingkan media agar darah domba dengan menghitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Rumus 1. Persentase Efektivitas

Keterangan:

X = Rerata diameter koloni *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda

C = Rerata diameter koloni *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah domba

3. Analisis Statistik

Data yang diperoleh merupakan data hasil pengukuran rerata diameter koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik normalitas data menggunakan program SPSS 25.0 untuk mengetahui sebaran data yang diperoleh normal atau tidak. Hasil pengujian terhadap normalitas distribusi data akan memberikan implikasi pada teknik statistik yang akan digunakan.

Hipotesis dalam pengambilan keputusan uji normalitas data adalah sebagai berikut:

H_0 : Data berdistribusi normal bila $Asym.Sig \geq 0.05$

H_a : Data berdistribusi normal bila $Asym.Sig < 0.05$

Data yang berdistribusi normal dapat dilakukan uji statistik menggunakan program SPSS 25 dengan uji statistik *Independent Samples T-test* untuk mengetahui perbedaan ukuran diameter media agar darah kuda dan agar darah domba. Namun, apabila data tidak berdistribusi normal, maka menggunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney U-Test* sebagai alternatif untuk menganalisis perbedaan tersebut.

H_0 : Tidak ada perbedaan pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda dan darah domba.

H_a : Ada perbedaan pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar darah kuda dan darah domba.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan sebagai izin Kelayakan Etik dengan nomor No.DP.04.03/e-KEPK.1/1343/2025 dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Peneliti menerapkan penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) secara lengkap, termasuk jas laboratorium, sepatu tertutup, sarung tangan dan masker selama pelaksanaan penelitian.

M. Hambatan Penelitian

Penelitian ini memiliki hambatan yang mempengaruhi proses pelaksanaan penelitian. Hambatan yang terjadi adalah kontaminasi selama proses penanaman bakteri mulai dari peremajaan bakteri. Media agar darah merupakan media yang kaya nutrisi sehingga semua jenis bakteri dapat tumbuh pada media tersebut, sehingga memungkinkan adanya kontaminasi bakteri.