

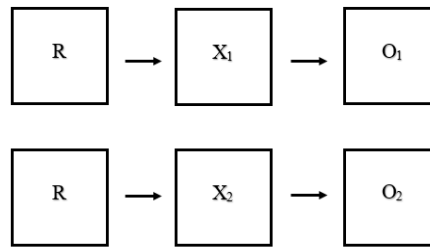
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan *quasi experimental design* karena memiliki kelompok kontrol, namun kontrol tersebut tidak dapat berfungsi secara optimal dalam menekan pengaruh variabel luar selama eksperimen berlangsung. Meski demikian, desain ini tetap dianggap lebih baik dibandingkan *pre-experimental design*. Penggunaan *quasi experimental design* dipilih karena pada kondisi nyata, peneliti kerap mengalami kendala dalam memperoleh kelompok kontrol yang memenuhi syarat penelitian (Muhyi dkk., 2018).

Desain penelitian yang digunakan adalah *static group comparison*. Dua kelompok yang dibandingkan adalah kelompok yang sudah terbentuk sebelumnya (*intact groups*), sehingga tidak dilakukan randomisasi. Kelompok perlakuan dan kelompok pembandingan hanya diukur setelah perlakuan diberikan (*post-test*), tanpa ada pengukuran awal (*pre-test*). Pengukuran hanya dilakukan setelah perlakuan. Kedua kelompok tidak dapat dipastikan memiliki kondisi awal yang sama karena tidak dibentuk melalui *random assignment*. Oleh karena itu, perbedaan hasil antar kelompok tidak dapat sepenuhnya dianggap sebagai akibat langsung dari perlakuan, karena faktor luar lainnya mungkin ikut mempengaruhi (Kpolovie, 2016). Rancangan penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 5. Desain Penelitian

Keterangan:

R = Bakteri *Enterococcus faecalis*

X₁ = Media *Blood Agar Plate* darah kuda

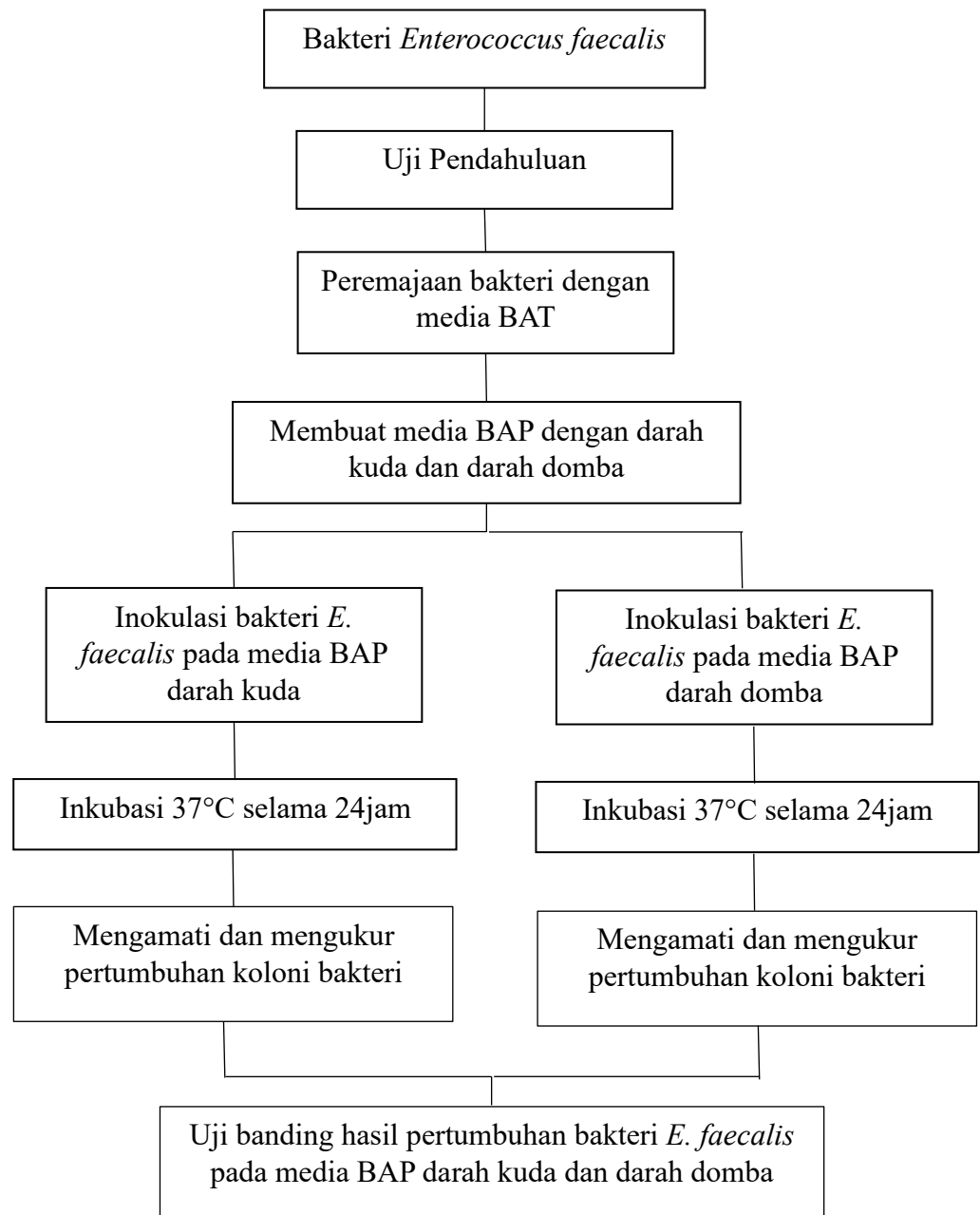
O₁ = Observasi hasil pertumbuhan *E. faecalis* pada BAP darah kuda

X₂ = Media *Blood Agar Plate* darah domba

O₂ = Observasi hasil pertumbuhan *E. faecalis* pada BAP darah domba

B. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 6. Rancangan Percobaan Subjek dan Objek

1. Subjek Penelitian

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

2. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah media *Blood Agar Base* (BAP) yang mengandung darah kuda Sandel (*Sandalwood horse*) 7.5% usia 5 tahun dengan berat $\pm 500\text{kg}$.

C. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari hingga Februari 2026 di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

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

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah morfologi dan diameter zona hemolisis bakteri *Enterococcus faecalis* pada masing – masing media BAP darah kuda dan darah domba.

3. Variabel Pengganggu

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

E. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah media BAP darah kuda dan darah domba. Sesuai dengan tujuannya, media BAP darah kuda dan darah domba dibedakan untuk melihat pengaruhnya dalam pertumbuhan bakteri *E.faecalis*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah morfologi bakteri *E. faecalis*, baik secara makroskopis dan mikroskopis, serta diameter zona hemolisis bakteri *E. faecalis*, yang akan diukur pada masing – masing media BAP darah kuda dan darah domba.

3. Variabel Pengganggu Terkendali

Pada penelitian ini variabel pengganggu terkendali adalah ketebalan media atau agar dan kontaminasi bakteri, karena bisa mempengaruhi pembacaan hasil dalam media BAP darah kuda maupun darah domba.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang diperoleh secara langsung dari sumber data tersebut oleh peneliti dengan teknik observasi, wawancara, *focus group discusion*, dan penyebaran kuesioner (Suhardi dan M. Hidayat, 2023). Data penelitian berupa observasi hasil karakteristik koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang tumbuh di media BAP darah kuda dan BAP darah domba. Data yang akan digunakan sejumlah 30 data meliputi diameter koloni, morfologu sel dan morfologi koloni *Enterococcus faecalis* dari kedua jenis media BAP.

G. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Labu Erlenmeyer
- b. Tabung reaksi
- c. Rak tabung reaksi
- d. Jarum ose
- e. Bunsen
- f. Jangka sorong digital
- g. *Oven*
- h. Inkubator
- i. Autoklaf
- j. Neraca
- k. *Ice box*
- l. *Ice pack*
- m. *Hot plate*
- n. Spidol
- o. Gunting

2. Bahan

- a. Isolat bakteri *Enterococcus faecalis*
- b. Darah domba
- c. Darah kuda
- d. *Blood Agar Base*
- e. *Disposable plate*

- f. Kantong darah
- g. *Aquasdest*
- h. Alkohol 95%
- i. *McFarland* 0,5%
- j. Cat Gram A (kristal violet)
- k. Cat Gram B (iodine lugol)
- l. Cat Gram C (etanol 96%)
- m. Cat Gram D (safranin)
- n. Kapas
- o. Kertas
- p. Plastik
- q. Tali rafia
- r. *Parafilm*

H. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini menggunakan jangka sorong digital sebagai alat ukur untuk menghitung diameter tunggal koloni bakteri *Enterococcus faecalis* pada media BAP. Pengukuran dipastikan tidak salah pembacaan karena jangka sorong yang digunakan adalah jangka sorong digital. Hasil pembacaan koloni bakteri akan muncul pada layar jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Sebelum penggunaan, dipastikan skala baca dalam keadaan *zero* (0,0 mm). Jangka sorong digital dapat digunakan lebih dari satu kali dan tetap akan menghasilkan data yang konsisten.

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan secara langsung oleh peneliti. 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 Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) laboratorium Mikrobiologi.

I. 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 kantong darah.

- 7) Memasukkan kantong darah 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 aquades sebanyak 400 ml ke *blood agar base* dalam labu Erlenmeyer, lalu dihomogenkan.
- 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 autoklaf dengan suhu 120°C selama ± 90 menit.
 - 8) Mengeluarkan labu erlenmeyer dari autoklaf dan menunggu *blood agar base* turun suhunya hingga hangat – hangat kuku ($36,5^{\circ}\text{C} - 40,5^{\circ}\text{C}$).
 - 9) Menambahkan darah kuda sebanyak 5 – 10% (20 – 40 ml/400 ml media) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi *blood agar base* steril, lalu dihomogenkan.
 - 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 aquades sebanyak 400 ml ke *blood agar base* dalam labu Erlenmeyer, lalu dihomogenkan.
 - 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 autoklaf dengan suhu 120°C selama ± 90 menit.
- 8) Mengeluarkan labu erlenmeyer dari autoklaf 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 7,5% (30 ml/400 ml media) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi *blood agar base* steril, lalu dihomogenkan.
- 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 sebanyak 7,5% ($\pm 7,5$ ml/100 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 *Enterococcus faecalis* pada media BAT.
- c. Melakukan inkubasi media BAT yang sudah ditanami bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama ± 24 jam.

- d. Mengidentifikasi koloni bakteri dari media BAT yang memiliki ciri morfologi dan sifat sesuai bakteri *E. Faecalis*.
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.
 - 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 tepat di tengah permukaan media BAP.
 - d. Menyebarkan suspensi bakteri uji menggunakan ose bulat dari tengah ke arah tepi membentuk struktur radial.
 - e. Mengambil koloni bakteri dari media BAT menggunakan ose yang sudah disterilisasi.
 - f. Melakukan inokulasi pada media BAP dengan cara *streak plate*.
 - g. Melakukan penanaman ulang sebanyak 10 kali masing – masing pada media BAP darah kuda dan darah 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 – 48 jam.

7. Pengamatan Hasil (Makroskopis koloni bakteri)

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Mengamati hasil inokulasi pertumbuhan bakteri *E. faecalis* pada media BAP.
- c. Memilih 30 koloni tunggal pada masing – masing media BAP darah kuda dan darah domba.
- d. Mengamati morfologi dan karakteristik bakteri pada masing – masing BAP darah kuda dan darah domba.
- e. Menghitung diameter koloni bakteri dengan jangka sorong digital.

8. Pengamatan Hasil (Mikroskopis koloni bakteri)

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b. Menyiapkan preparat ulas dari koloni *E. faecalis* yang tumbuh pada media BAP darah kuda dan darah domba.
- c. Melakukan fiksasi preparat dan pewarnaan Gram sesuai prosedur.
- d. Mengamati preparat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran yang sesuai.

- e. Mengamati dan mengidentifikasi karakteristik mikroskopis *E. faecalis* pada masing – masing media BAP darah kuda dan dan darah domba.
- f. Mencatat dan mendokumentasikan hasil pengamatan berupa bentuk sel, susunan sel dan reaksi pewarnaan gram yang diperoleh.

J. Manajemen Data

1. Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif bertujuan untuk mengolah data yang meliputi diameter koloni, morfologi koloni dan zona hemolitik agar memperoleh nilai minimal, maksimal, selisih dan rata – rata dari setiap pengamatan. Analisis deskriptif diterapkan untuk seluruh data yang diperoleh kemudian hasilnya disajikan dalam bentuk gambar dan tabel agar lebih mudah dipahami dan dibandingkan.

2. Analisis Analitik

Analisis analitik dilakukan untuk menilai perbedaan kemampuan media BAP darah kuda dan darah domba dalam mendukung pertumbuhan bakteri *Enterococcus aureus*. Parameter yang digunakan adalah diameter koloni, karena ukuran koloni dapat memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai kualitas pertumbuhan bakteri pada masing-masing media. Melalui perbandingan diameter koloni tersebut, dapat diketahui tingkat efektivitas darah kuda sebagai media pertumbuhan bakteri, yaitu apakah mampu menghasilkan pertumbuhan

yang sebanding dengan media darah domba yang digunakan sebagai standar.

Perhitungan yang digunakan untuk menilai rasio efektivitas adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

X = Rata-rata diameter koloni *E. faecalis* pada media BAP darah kuda

C = Rata-rata diameter koloni *E. faecalis* pada media BAP darah domba

3. Analisis Statistik

Data yang diperoleh merupakan hasil perhitungan diameter koloni bakteri *Enterococcus faecalis*. Data yang didapatkan kemudian dilakukan uji distribusi (*test of normality*) menggunakan program SPSS versi 16.0 untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji distribusi data menjadi dasar dalam menentukan jenis uji statistik yang akan digunakan pada tahap analisis selanjutnya. Hipotesis pengambilan keputusan pada uji distribusi data sebagai berikut:

H_0 : Data berdistribusi normal apabila *Sig (Saphiroo-Wilk)* $\geq 0,05$

H_a : Data berdistribusi normal apabila *Sig (Saphiroo-Wilk)* $< 0,05$

Data yang berdistribusi normal dapat dilanjutkan dengan uji statistik yaitu *Independent Sample Test* untuk menguji perbedaan rata – rata antara dua kelompok independen. Data yang tidak berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji statistik *Mann Whitney* untuk menguji perbedaan

median atau distribusi antara dua kelompok independen. Hipotesis statistik yang digunakan sebagai dasar dalam pengambilan keputusan sebagai berikut:

H_0 : Tidak ada perbedaan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) darah kuda dan darah domba.

H_a : Ada perbedaan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *Blood Agar Plate* (BAP) darah kuda dan darah domba.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan setelah memperoleh persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Selama pelaksanaan penelitian, peneliti akan menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) secara lengkap, meliputi jas laboratorium, sepatu tertutup, sarung tangan dan masker. Penerapan APD tersebut bertujuan untuk menjaga kesehatan dan keselamatan (K3) di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.