

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

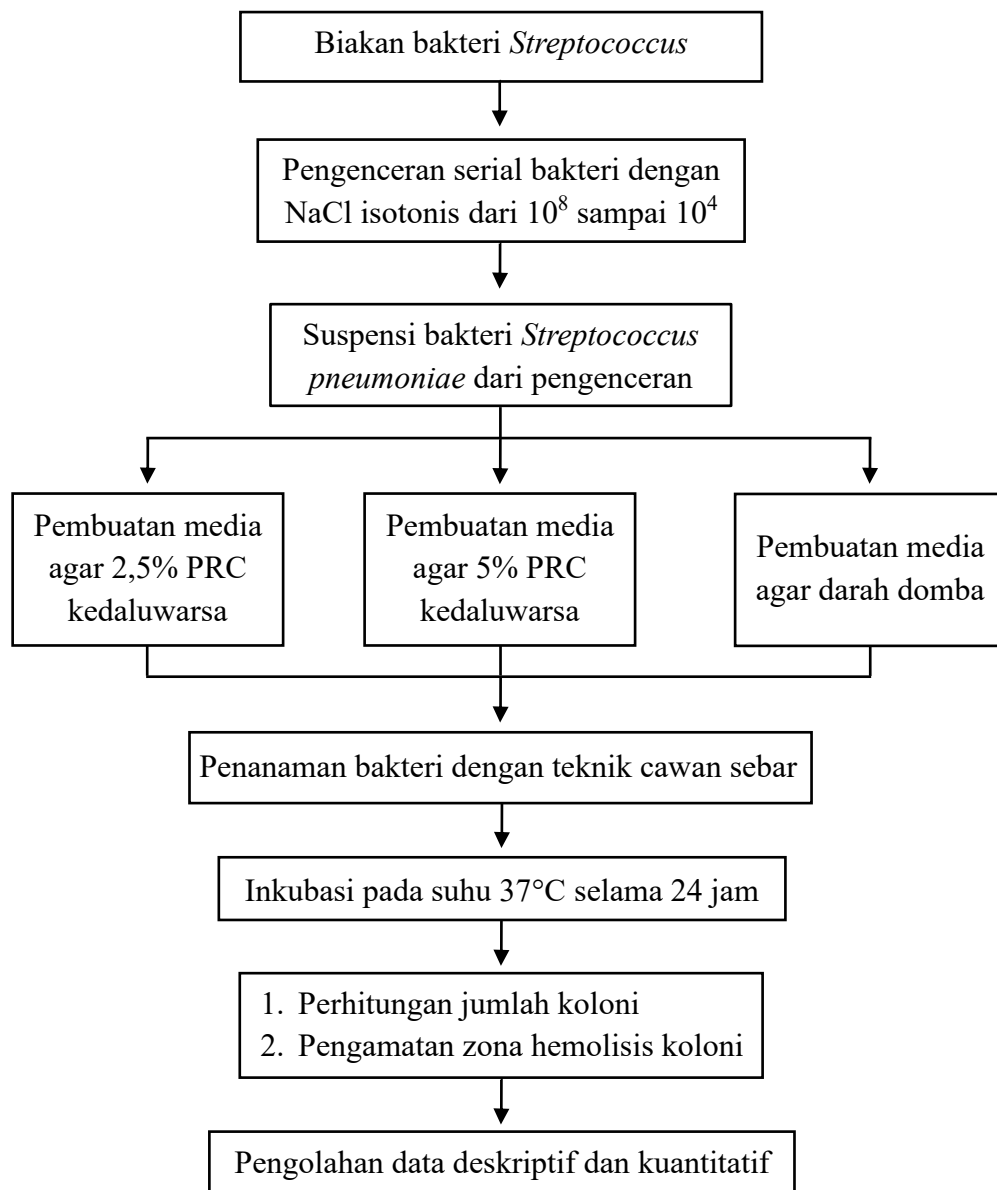
1. Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional karena tidak melibatkan intervensi atau perlakuan yang diberikan. Penelitian dilakukan dengan pengamatan objektif terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara alami tanpa memberikan intervensi yang mengubah sifat dasar mikroorganisme tersebut. Selain itu, terdapat kelompok pembandingan berupa media agar darah domba yang digunakan untuk mengukur kelayakan media agar darah PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5% dan 5%. Hal ini diukur melalui perbandingan data pertumbuhan yang dihasilkan berupa data jumlah koloni dan zona hemolisis koloni bakteri (Notoatmodjo, 2010; Turista dan Puspitasari, 2019).

2. Desain penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cross-sectional*. Penerapan desain ini didasarkan pada teknik pengambilan data variabel terikat, yaitu jumlah koloni dan zona hemolisis, yang dilakukan satu kali waktu pengamatan. Pengukuran dan obsevasi variabel dilakukan secara serentak segera setelah masa inkubasi berakhir guna memperoleh gambaran data (Notoatmodjo, 2010).

B. Alur Penelitian



Gambar 6. Rancangan Percobaan

C. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah darah donor manusia yang diperoleh dari BDRS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Darah yang digunakan untuk penelitian ini adalah 10 PRC kedaluwarsa dalam kantong aseptik. *Packed Red*

Cell kedaluwarsa dengan konsentrasi 2,5% dan 5% digunakan dalam pembuatan media agar darah untuk menumbuhkan *Streptococcus pneumoniae* ATCC. Selain itu, darah domba digunakan untuk pembuatan media agar darah domba sebagai pembanding. Jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 10 sampel media agar PRC kedaluwarsa 2,5%, 10 sampel media agar PRC kedaluwarsa 5% dan 10 sampel media agar darah domba (Vygovska, 2020). Batas minimal jumlah sampel diperoleh dari rumus Federer (Masriadi, Baharuddin dan Samsualam, 2022).

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(3-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 7,5$$

$$r \geq 8,5$$

Keterangan:

t = banyak kelompok perlakuan

r = jumlah sampel setiap kelompok perlakuan

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2026.

2. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan media agar darah domba dalam skala data nominal.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah koloni (CFU) yang disajikan dalam skala data rasio dan zona hemolisis koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang disajikan dalam skala data nominal.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi penyebab perubahan dan mempengaruhi variabel terikat. Variabel ini juga disebut dengan variabel independen.

a. Media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%

Media agar PRC kedaluwarsa adalah media agar yang menggunakan 2,5% PRC kedaluwarsa. Darah dari PMI di Yogyakarta dan BDRS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta dalam keadaan aseptik dan sudah kedaluwarsa atau melebihi batas simpan 35 hari. Pada penelitian ini digunakan PRC yang telah kedaluwarsa 1–4 minggu. Pemilihan konsentrasi 2,5% didasarkan pada kadar hemoglobin PRC kedaluwarsa yang dua kali lebih banyak daripada darah domba.

b. Media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5%

Media agar PRC kedaluwarsa adalah media agar yang menggunakan 5% PRC kedaluwarsa. Darah dari PMI di Yogyakarta dan BDRS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta dalam keadaan aseptik dan sudah kedaluwarsa atau melebihi batas simpan 35 hari. Pada penelitian ini digunakan PRC yang telah kedaluwarsa 1–4 minggu. Pemilihan konsentrasi 5% didasarkan pada SOP standar yang digunakan untuk pembuatan media agar darah.

c. Media agar darah domba

Media agar darah domba adalah media agar darah standar karena menggunakan suplemen darah domba sebanyak 5%. Darah domba yang digunakan adalah hasil pengambilan darah vena pada domba lokal menggunakan kantong donor yang berisi antikoagulan CPDA. Darah dalam keadaan aseptik, tidak hemolisis dan tidak kedaluwarsa.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang diukur dan dianalisis. Variabel ini dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel ini disebut variabel dependen.

a. Jumlah koloni bakteri

Jumlah koloni bakteri merupakan penanda kemampuan pertumbuhan bakteri yang dihitung dalam satuan *Colony Forming Unit* (CFU). Data disajikan ke dalam tabel data primer dengan skala rasio.

b. Zona hemolisis koloni bakteri

Zona hemolisis adalah zona yang terbentuk di sekitar koloni akibat dari aktivitas bakteri yang melisiskan sel darah merah. Zona hemolisis koloni diukur dengan melihat ada tidaknya zona hemolisis pada media.

Data disajikan ke dalam tabel data primer dengan skala nominal.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer yang dikumpulkan secara langsung dari perhitungan jumlah koloni dan pengamatan zona hemolisis koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan media agar darah domba. Data penelitian berupa hasil perhitungan jumlah koloni dan pengamatan zona hemolisis koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang tumbuh pada media agar darah. Masing-masing variabel terdiri dari 10 sampel dengan total 30 data.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Instrumen penelitian

- | | |
|--------------------|----------------|
| a. Neraca analitis | f. Corong |
| b. Gelas timbang | g. Inkubator |
| c. Labu erlenmeyer | h. Cawan petri |
| d. Pengaduk | i. Pipet ukur |
| e. Gelas ukur | j. Ice box |

- k. Bunsen
- l. Tabung reaksi
- m. *Cell spreader*
- 2. Bahan penelitian
 - a. *Blood agar base (2 gram heart muscle infusion from, 13 gram pancreatic digest of casein, 5 gram yeast extract, 5 gram sodium chloride, 15 gram agar)*
 - b. Akuades
 - c. NaCl
 - d. *Packed red cell* kedaluwarsa
 - e. Darah domba
 - f. Bakteri *Streptococcus pneumoniae*
 - n. Spidol
 - o. Autoklaf

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

1. Alat ukur atau instrumen

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni bakteri. Penelitian ini menggunakan pengamatan mata secara langsung untuk menghitung jumlah koloni dan melihat zona hemolisis bakteri. Selama proses perhitungan jumlah koloni, semua koloni dapat dipastikan terhitung dengan baik tanpa terlewat atau terulang. Koloni yang sudah dihitung telah ditandai dengan spidol. Validitas didukung oleh pencahayaan dan latar belakang yang baik untuk memastikan setiap koloni dapat teridentifikasi. Reliabilitas dipastikan melalui konsistensi hasil perhitungan. Setiap sampel dilakukan perhitungan ulang tiga kali.

Validitas pengamatan zona hemolisis diperkuat dengan penggunaan kontrol positif bakteri *Streptococcus pneumoniae* strain ATCC pada media standar agar darah domba sebagai acuan karakteristik alfa hemolisis yang seharusnya tampak pada media. Reliabilitas dijamin melalui konsistensi pengamatan menggunakan kriteria ada atau tidak ada zona hemolisis. Pengamatan dilakukan oleh peneliti dengan verifikasi ahli atau pengamat kedua, yaitu TTLM RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta untuk memastikan hasil pengamatan tetap konsisten dan tidak subjektif. Perhitungan dan pengamatan dilakukan masing-masing sebanyak 10 kali untuk kelompok media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan media agar darah domba.

2. Pengukur

Pengambilan data dilakukan oleh peneliti sendiri. Peneliti adalah mahasiswa Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta Jurusan Teknologi Laboratorium Medis semester 8 yang sudah lulus mata kuliah Bakteriologi teori dan praktik 8 SKS. Pada saat penelitian, peneliti akan didampingi oleh TTLM RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta.

J. Prosedur Penelitian

1. Pengadaan bakteri *Streptococcus pneumoniae*

Bakteri *Streptococcus pneumoniae* ATCC merupakan isolat bakteri yang diperoleh dari Universitas Sebelas Maret.

2. Pengadaan PRC kedaluwarsa

Packed red cell kedaluwarsa diperoleh dari BDRS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta.

3. Sterilisasi alat

- a. Disiapkan alat dan bahan yang akan disterilisasi.
- b. Dicuci pada air mengalir dan ditunggu hingga kering.
- c. Dibungkus rapat menggunakan kertas.
- d. Disusun rapi di dalam autoklaf lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 12–24 jam.

4. Pembuatan media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%

- a. Ditimbang 1,6 gram serbuk *blood agar base*, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer.
- b. Ditambahkan 39 ml akuades, dihomogenkan lalu ditutup kapas dan diikat plastik.
- c. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, ditunggu suhu turun sambil dikeluarkan sisa uap air, labu media diambil dibiarkan sampai hangat kira-kira suhu 50°C.
- d. Ditambahkan 1 ml PRC kedaluwarsa pada suhu kamar ke dalam media.
- e. Dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik hingga menutupi seluruh permukaan wadah kira-kira 20 ml per cawan petri.
- f. Ditunggu hingga memadat kemudian dibalik untuk melihat media agar sudah tidak mengalir atau tumpah.
- g. Media disimpan di dalam lemari pendingin jika tidak segera digunakan.

5. Pembuatan media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5%
 - a. Ditimbang 1,6 gram serbuk *blood agar base*, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer.
 - b. Ditambahkan 38 ml akuades, dihomogenkan lalu ditutup kapas dan diikat plastik.
 - c. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, ditunggu suhu turun sambil dikeluarkan sisa uap air, labu media diambil dibiarkan sampai hangat kira-kira suhu 50°C.
 - d. Ditambahkan 2 ml PRC kedaluwarsa pada suhu kamar ke dalam media.
 - e. Dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik hingga menutupi seluruh permukaan wadah kira-kira 20 ml per cawan petri.
 - f. Ditunggu hingga memadat kemudian dibalik untuk melihat media agar sudah tidak mengalir atau tumpah.
 - g. Media disimpan di dalam lemari pendingin jika tidak segera digunakan.
6. Pembuatan media agar darah domba
 - a. Ditimbang 16 gram serbuk media *blood agar base*, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer.
 - b. Ditambahkan 380 ml akuades, dihomogenkan lalu ditutup kapas dan diikat plastik.
 - c. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, ditunggu suhu turun sambil dikeluarkan sisa uap air, labu media diambil dibiarkan sampai hangat kira-kira suhu 50°C.
 - d. Ditambahkan 20 ml darah domba pada suhu kamar ke dalam media.

- e. Dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik hingga menutupi seluruh permukaan wadah kira-kira 20 ml per cawan petri.
 - f. Ditunggu hingga memadat kemudian dibalik untuk melihat media agar sudah tidak mengalir atau tumpah.
 - g. Media disimpan di dalam lemari pendingin jika tidak segera digunakan.
7. Pembuatan suspensi bakteri
- a. Diambil koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* menggunakan ose bulat.
 - b. Dimasukkan ke dalam larutan NaCl isotonis 3 ml, dihomogenkan.
 - c. Dibandingkan tingkat kekeruhan dengan standar mcFarland 0,5% hingga kepadatan sel bakteri setara dengan 10^8 .
 - d. Dipipet suspensi bakteri 10^8 sebanyak 0,5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 4,5 ml NaCl isotonis. Kemudian dilakukan pengenceran serial dari kekeruhan 10^8 sampai 10^4 .
 - e. Suspensi bakteri dari masing-masing pengenceran dilakukan inokulasi dengan cara memipet 100 μ l suspensi bakteri.
 - f. Diletakkan suspensi bakteri pada media, kemudian disebar menggunakan *cell spreader* membentuk struktur radial.
 - g. Media yang ditanami bakteri *Streptococcus pneumoniae* dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam.
 - h. Diamati persebaran koloni bakteri pada semua cawan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan.

8. Inokulasi bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan darah domba
 - a. Diambil suspensi bakteri dari pengenceran yang memenuhi syarat (10^4) menggunakan mikropipet sebanyak 100 μ l (0,1 mL).
 - b. Diletakkan suspensi bakteri pada media, kemudian disebarakan menggunakan *cell spreader* secara merata pada media.
 - c. Diinokulasikan pada media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan darah domba.
 - d. Media yang ditanami bakteri *Streptococcus pneumoniae* dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam.
9. Pengamatan koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae*
 - a. Dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan pengamatan langsung.
 - b. Dilakukan pengamatan zona hemolisis koloni bakteri secara langsung dengan mata.

K. Manajemen Data

1. Penyajian data

Data primer yang terkumpul dari penelitian ini disusun dan disajikan dalam bentuk tabel yang memuat data jumlah koloni dan data hasil pengamatan zona hemolisis koloni bakteri yang tumbuh pada media agar

PRC kedaluwarsa konsentrasi 2,5%, media agar PRC kedaluwarsa konsentrasi 5% dan media agar darah domba.

2. Analisis deskriptif

Analisis ini bertujuan untuk meringkas dan mendeskripsikan karakteristik dasar dari data yang terkumpul secara deskriptif. Data menggambarkan jumlah koloni dan zona hemolisis sebagai ukuran sebaran data untuk setiap kelompok perlakuan.

3. Analisis kuantitatif

a. Jumlah koloni

Data jumlah koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* dihitung secara manual. Analisis kuantitatif dilakukan tanpa melalui uji statistik inferensial, melainkan difokuskan pada perhitungan Nilai PR sesuai dengan standar ISO 11133:2014. Nilai PR dihitung menggunakan rumus:

$$P_R = \frac{\text{Jumlah koloni pada media uji}}{\text{Jumlah koloni pada media referensi}}$$

Hasil perhitungan nilai PR kemudian dibandingkan dengan ambang batas validasi media yang ditetapkan oleh ISO 11133:2014. Media dinyatakan memiliki performa yang baik dan memadai apabila memiliki nilai $PR \geq 0,70$. Nilai di bawah 0,7 mengindikasikan bahwa media tersebut memiliki defisiensi nutrisi atau mengandung zat inhibitor yang menghambat pertumbuhan bakteri secara signifikan (ISO, 2014).

b. Zona hemolisis

Data zona hemolisis dianalisis secara deskriptif kuantitatif untuk mengevaluasi fungsi diferensial media dengan mencatat data keberadaan zona hemolisis pada ketiga kelompok media. Data disajikan dalam bentuk tabel dari hasil perhitungan persentase kemunculan zona hemolisis.

L. Etika Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Komite etik RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta menyatakan penelitian ini layak etik pada tanggal 4 Mei 2026 dengan nomor surat 00183/KT.7.4/V/2026.

M. Kelemahan Penelitian

Salah satu tantangan dalam penelitian ini terletak pada proses penyiapan inokulum dan pengenceran bertingkat yang harus memenuhi kriteria akurasi sesuai standar ISO 11133:2014. Secara teknis, terdapat hambatan dalam menjaga homogenitas suspensi bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Meskipun proses penghomogenan telah dilakukan menggunakan *vortex mixer* sesuai prosedur standar, kecenderungan bakteri untuk tetap bergerombol dan tidak tercerai-berai secara merata berpotensi menyebabkan variabilitas pada jumlah koloni yang tumbuh di media agar.