

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

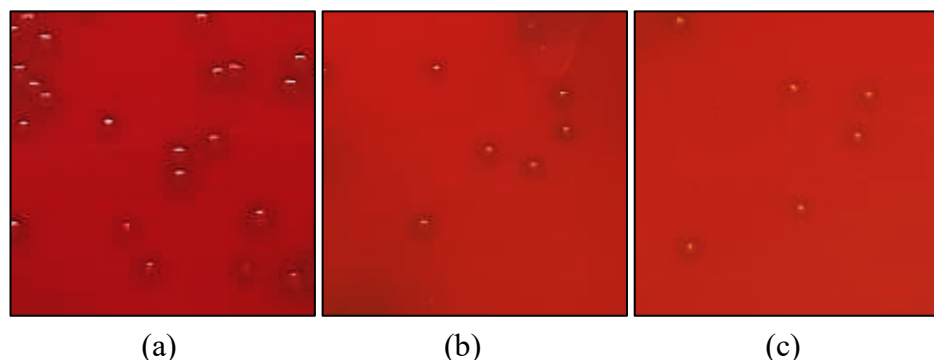
A. Hasil Penelitian

Penelitian dengan judul “Perbedaan Jumlah Koloni dan Zona Hemolisis *Streptococcus pneumoniae* pada Media Agar *Packed Red Cell* Kedaluwarsa Konsentrasi 2,5% dan 5%” dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan sampel berupa PRC yang telah kedaluwarsa 1–4 minggu dan darah domba segar dengan CPDA yang selanjutnya dibuat media agar darah. Media tersebut ditanami bakteri uji *Streptococcus pneumoniae* dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang tumbuh pada media agar darah domba, PRC kedaluwarsa 2,5% dan 5% diamati karakteristik koloni, dilakukan pewarnaan Gram dan uji katalase, dihitung jumlah koloni dan diamati keberadaan zona hemolisisnya.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa koloni *Streptococcus pneumoniae* pada media kontrol agar darah domba, maupun media agar PRC kedaluwarsa 5% dan 2,5% memiliki bentuk bulat atau circular dengan warna putih keabu-abuan. Secara detail, koloni pada ketiga media tersebut memiliki tepian yang teratur, permukaan yang halus, serta elevasi yang cembung. Dari segi konsistensi, koloni yang tumbuh menunjukkan tekstur yang keras saat dilakukan penyentuhan menggunakan jarum ose.

Meskipun secara kualitatif memiliki kemiripan, terdapat perbedaan nyata pada dimensi atau ukuran diameter koloni di antara ketiga jenis media. pada media agar darah domba, koloni tampak tumbuh paling besar sekitar 1,30–1,65mm, gemuk dan menonjol. Pada media agar PRC kedaluwarsa 5%, ukuran koloni berkisar 0,90–1,25mm, cenderung sedang dan lebih kecil dibandingkan pada agar darah domba. Sedangkan, pada media agar PRC kedaluwarsa 2,5%, koloni tumbuh dengan diameter paling kecil atau menyerupai titik berukuran 0,60–0,95mm.

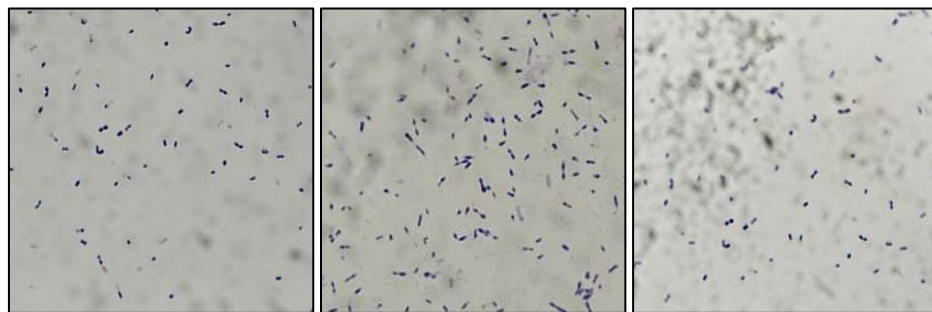
Selain morfologi koloni, parameter zona hemolisis juga menunjukkan perbedaan intensitas visual. Hasil pengamatan mengonfirmasi bahwa reaksi alfa-hemolisis (α -hemolisis) muncul secara konsisten (100%) pada seluruh media, ditandai dengan terbentuknya zona berwarna kehijauan di sekitar koloni. Namun, terdapat variasi pada tingkat kejelasan visual zona hemolisis. Intensitas ketajaman dan lebar zona hemolisis terbesar teramati pada media agar darah domba, diikuti agar darah manusia kedaluwarsa 5% dan agar darah manusia kedaluwarsa 2,5%.



Gambar 7. Pertumbuhan Koloni Bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang Diinkubasi selama 24 Jam pada (a) Media Agar Darah Domba (b) Media Agar PRC Kedaluwarsa 5% dan (c) Media Agar PRC Kedaluwarsa 2,5%

Gambar 7 menunjukkan bahwa pada media agar darah domba, zona hemolisis alfa tampak paling lebar sekitar 1,95–2,25mm, sangat jelas, dan memiliki kontras yang tinggi terhadap warna dasar media yang merah pekat. Pada media agar PRC 5%, zona hemolisis masih tampak jelas tetapi dengan lebar yang sedikit berkurang berkisar 1,65–1,90mm. Sementara itu, pada Media Agar PRC 2,5%, zona hemolisis terlihat paling sempit dan samar dengan ukuran 1,40–1,65mm. Hal ini selaras dengan penampakan warna dasar media agar PRC kedaluwarsa 2,5% yang paling terang dibandingkan media lainnya. Meskipun tampak lebih samar dan sempit, karakteristik alfa-hemolisis pada agar PRC kedaluwarsa 2,5% tetap dapat teridentifikasi secara memadai dan tidak mengubah interpretasi diagnostik terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

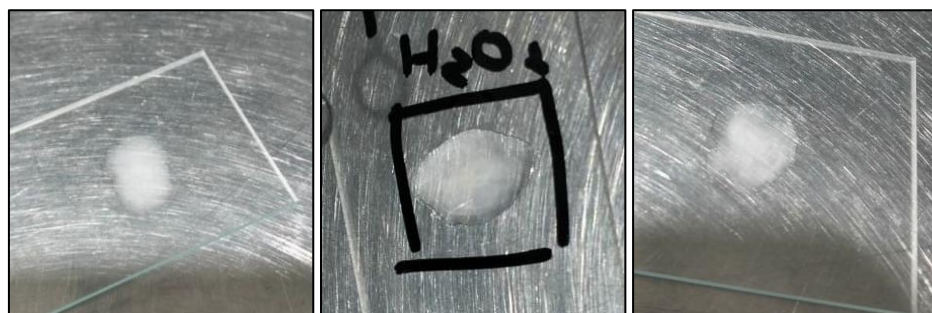
Kemudian, dilakukan uji identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram dan uji katalase. Hasil uji identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram ditunjukkan pada Gambar 8. Identifikasi bakteri melalui pewarnaan Gram dilakukan terhadap koloni yang tumbuh pada media agar darah. Berdasarkan pengamatan, isolat menunjukkan karakteristik Gram-positif dengan sel berwarna ungu. Morfologi sel berbentuk bulat (kokus) dan berpasangan (*diplococcus*) atau membentuk rantai pendek.



(a) (b) (c)

Gambar 8. Pewarnaan Gram Koloni Bakteri Perbesaran 100x yang Ditanam pada (a) Media Agar Darah Domba (b) Media Agar PRC Kedaluwarsa 5% dan (c) Media Agar PRC Kedaluwarsa 2,5%

Selain itu, uji konfirmasi melalui uji katalase pada Gambar 9 dilakukan untuk membedakan *Streptococcus sp.* dari genus bakteri lainnya. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak terbentuk gelembung gas yang menandai bahwa bakteri uji merupakan bakteri *Streptococcus sp.* Berdasarkan semua uji identifikasi karakteristik bakteri yang telah dilakukan pada media agar darah, didapatkan hasil identifikasi bakteri *Streptococcus pneumoniae*.



(a) (b) (c)

Gambar 9. Uji Katalase Koloni Bakteri yang Ditanam pada (a) Media Agar Darah Domba (b) Media Agar PRC Kedaluwarsa 5% dan (c) Media Agar PRC Kedaluwarsa 2,5%

Kemudian dilakukan hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada ketiga media agar darah untuk mengetahui nilai PR. Ringkasan hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan *Productivity Ratio*

Media	Jumlah Sampel	Rerata Koloni	Nilai PR	Nilai Minimal	Kesimpulan
PRC kedaluwarsa 5%	10	120,7	1,005	0,70	Diterima
PRC kedaluwarsa 2,5%	10	126,6	1,055	0,70	Diterima

Sumber: Data Primer Terolah, Tahun 2026

Berdasarkan ISO 1133:2014, perhitungan *Productivity Ratio* (PR) diperlukan untuk mengukur kualitas media kultur bakteri. Nilai PR agar PRC kedaluwarsa 5% adalah 1,005 dan agar PRC kedaluwarsa 2,5% sebesar 1,055. Kedua nilai tersebut berada di atas ambang batas minimal yang ditetapkan, yaitu lebih dari 0,70 (ISO, 2014).

Tabel 2. Hasil Pengamatan Zona Hemolisis *Streptococcus pneumoniae*

Variabel	Jumlah Sampel (n)	Positif α -Hemolisis	Persentase
Darah domba	10	10	100%
PRC kedaluwarsa 5%	10	10	100%
PRC kedaluwarsa 2,5%	10	10	100%

Sumber: Data Primer Terolah, Tahun 2026

Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa tidak terdapat variasi data antara semua variabel. Data keberadaan zona hemolisis menunjukkan hasil positif pada seluruh sampel dengan persentase 100%. Hasil ini membuktikan bahwa kemampuan media agar PRC 2,5% dan 5% setara dengan media agar darah domba dalam mengekspresikan sifat hemolisis bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

B. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi penggunaan darah manusia jenis PRC kedaluwarsa sebagai suplemen dalam pembuatan media

agar darah untuk pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh temuan bahwa agar PRC kedaluwarsa 5% dan 2,5% mampu mendukung pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara optimal. Pemanfaatan darah manusia kedaluwarsa sebagai substitusi media didukung oleh beberapa peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa limbah darah masih memiliki potensi nutrisi bagi mikroorganisme (Djannatun dkk, 2008; Mudatsir, 2014; Novita dan Febrianti, 2019). Hasil pada media uji tersebut setara dengan media pembanding agar darah domba yang selama ini menjadi standar emas dalam pembuatan media agar darah (Dilrukshi dkk, 2018; Miguel dan Pereira, 2024; Russell dkk, 2006).

Berdasarkan pengamatan visual, ditemukan adanya perbedaan ukuran (diameter) koloni yang nyata meskipun secara kualitatif seluruh media mampu menumbuhkan bakteri dengan ciri khas spesies yang identik. Koloni pada seluruh media berbentuk bulat, berwarna putih keabu-abuan, dan memiliki elevasi cembung (*convex*) yang mencirikan keberadaan kapsul polisakarida sebagai faktor virulensi utama (Mahdi dan Abed, 2024; Oktari dkk, 2019). Secara visual, koloni pada media agar darah domba tampak paling besar dan gemuk, diikuti oleh media agar PRC 5% dengan ukuran sedang, dan media agar PRC 2,5% yang menunjukkan koloni paling kecil atau menyerupai titik.

Mekanisme perbedaan ukuran ini berkaitan dengan optimalisasi nutrisi dan ketersediaan energi. Darah domba sebagai standar emas

menyediakan lingkungan yang paling seimbang bagi pertumbuhan struktural bakteri tanpa hambatan metabolik (Bonnet et al., 2020). Sebaliknya, pada agar PRC kedaluwarsa, meskipun secara kuantitatif jumlah koloni ditemukan lebih banyak, ukuran koloni individu cenderung lebih kecil. Hal ini disebabkan oleh tingginya kepadatan koloni pada agar PRC yang memicu kompetisi nutrisi antar sel di area terbatas (ISO, 2014). Selain itu, keberadaan sisa larutan pengawet seperti dextrose dalam produk PRC mendorong bakteri melakukan fermentasi karbohidrat secara cepat yang menghasilkan asam, sehingga memicu stres lingkungan yang membatasi ekspansi diameter koloni dibandingkan pada media darah domba yang rendah glukosa (Russell et al., 2006).

Perhitungan nilai PR berdasarkan ISO 11133:2014 memperkuat temuan ini. Nilai PR yang diperoleh adalah 1,055 untuk agar PRC kedaluwarsa 2,5% dan 1,005 untuk agar PRC kedaluwarsa 5%. Kedua nilai ini berada di atas ambang batas minimal validasi yang ditetapkan oleh ISO 11133:2014, yaitu lebih dari 0,70 dan tidak melampaui nilai 1,40 (ISO, 2014; Sandle, 2016). Pencapaian nilai PR di atas 1,00 menunjukkan bahwa agar PRC kedaluwarsa 2,5% dan 5% memiliki tingkat pemulihan (*recovery*) yang melampaui kemampuan media agar darah domba sebagai standar emas. Hal ini memberikan argumen kuat bahwa darah manusia jenis PRC memiliki kualitas nutrisi yang ekuivalen dengan darah domba dalam mendukung pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Kemampuan PRC dalam mendukung pertumbuhan ini dipengaruhi oleh kandungan

hemoglobin yang tinggi sebagai sumber Faktor X (hemin) dan katalase yang krusial bagi bakteri *fastidious* seperti bakteri *Streptococcus pneumoniae* (Aneja dan Aneja, 2023; Bonnet dkk, 2020; Carozzi, 2023; Salwan dan Sharma, 2023).

Hasil pengamatan terhadap aktivitas diferensial media menunjukkan bahwa ketiga kelompok media berhasil mengekspresikan zona alfa-hemolisis secara konsisten. Secara visual, terdapat gradasi lebar zona hijau di sekitar koloni, di mana Media Agar Darah Domba menghasilkan zona paling lebar dan kontras, diikuti oleh agar PRC kedaluwarsa 5%, dan agar PRC kedaluwarsa 2,5% dengan zona yang paling sempit serta samar. Reaksi ini terjadi akibat produksi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh bakteri yang mengoksidasi hemoglobin (besi Fe^{2+}) menjadi methemoglobin (besi Fe^{3+}) yang berwarna kehijauan (Alexandrova dkk, 2025; Mcdevitt dkk, 2020).

Ketajaman dan lebar zona hemolisis pada darah domba dipengaruhi oleh ukuran eritrosit domba yang lebih kecil dan membran sel yang lebih rapuh (*fragile*), sehingga memudahkan penetrasi enzim pneumolisin bakteri untuk mendegradasi hemoglobin secara merata (Žaja dkk, 2019). Pada agar PRC kedaluwarsa, lebar zona hemolisis berbanding lurus dengan konsentrasi hemoglobin yang ditambahkan. Pada konsentrasi 2,5%, jumlah eritrosit sebagai substrat reaksi kimia hanya tersedia dalam jumlah minimal, sehingga bahan baku yang diubah menjadi methemoglobin terbatas dan menyebabkan zona tampak samar serta sempit (Lestari, 2012). Meskipun pada agar PRC kedaluwarsa 2,5% zona hemolisis alfa tidak selebar pada

darah domba, fungsionalitas media sebagai indikator biokimia tetap dinyatakan memadai karena perubahan warna hijau tetap dapat teridentifikasi secara jelas untuk kepentingan diagnostik (Oktari dkk, 2019).

Meskipun darah manusia sering dikhawatirkan mengandung zat inhibitor seperti antibodi spesifik atau sisa antibiotik dari donor, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa faktor-faktor tersebut tidak memberikan pengaruh penghambatan yang nyata (Mollabashi dkk, 2025; Russell dkk, 2006). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh proses pengolahan darah menjadi produk PRC yang membuat konsentrasi eritrosit lebih pekat dan bersih dari zat inhibitor dibandingkan dengan darah utuh (*whole blood*) (Niederstebruch dkk, 2017; Zimna dkk, 2021). Hal ini didukung oleh temuan bahwa jumlah koloni pada konsentrasi rendah tetap tinggi, yang mengindikasikan bahwa rasio nutrisi terhadap zat penghambat berada pada rentang yang ideal (Lestari, 2012).

Temuan dalam penelitian ini selaras dengan hasil studi yang dilakukan oleh Niederstebruch, dkk. (2017), yang menunjukkan bahwa penggunaan darah manusia dengan antikoagulan CPDA pada konsentrasi 2,5% terbukti efektif sebagai media alternatif untuk isolasi berbagai spesies bakteri dari genus *Streptococcus*. Hal ini memperkuat hasil penelitian ini bahwa konsentrasi 2,5% pada jenis darah pekat seperti PRC sudah mencukupi kebutuhan nutrisi bakteri tanpa menghambat pertumbuhannya. Dukungan terhadap efektivitas media ini juga dikemukakan oleh Oktari, Vanawati dan Kurniawati (2019), yang menyatakan bahwa media agar darah manusia

memiliki potensi besar sebagai pengganti agar darah domba, khususnya untuk kultivasi *Streptococcus pneumoniae*.

Kesamaan hasil pertumbuhan dan ekspresi hemolisis pada penelitian ini dengan temuan Niederstebruch, dkk. (2017) dan Oktari, Vanawati dan Kurniawati (2019) diduga berkaitan dengan karakteristik jenis darah PRC yang digunakan. Darah PRC telah melalui proses pemisahan plasma, zat-zat inhibitor alami seperti antibodi dan sistem komplemen telah tereduksi secara signifikan, mirip dengan prinsip optimasi melalui pencucian sel darah merah. Dengan demikian, integrasi temuan ini dengan penelitian terdahulu semakin memperkuat argumen bahwa modifikasi konsentrasi darah manusia donor, khususnya jenis PRC 2,5% dan 5%, memiliki validitas fungsional yang setara dengan media standar internasional dalam mendukung pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* (Niederstebruch dkk, 2017). Pemanfaatan PRC kedaluwarsa untuk keperluan diagnostik laboratorium mikrobiologi dapat menekan biaya operasional sekaligus mengatasi kendala ketersediaan darah domba di daerah terpencil (Oktari dkk, 2019).

Namun demikian, penelitian ini memiliki keterbatasan tertentu. Proses pembuatan suspensi bakteri dalam penelitian ini menghadapi kendala teknis pada tahap homogenisasi sel. Kondisi suspensi yang kurang homogen ini berisiko menimbulkan ketidakakuratan dalam pembacaan densitas inokulum. Sel yang tidak terurai dapat memengaruhi nilai absorbansi dan menyebabkan kesalahan estimasi jumlah bakteri yang sebenarnya (Salwan

dan Sharma, 2023). Selain itu, penelitian ini terbatas pada penggunaan strain ATCC dan tidak melibatkan isolat klinis dari pasien. Penggunaan strain ATCC belum tentu merepresentasikan variabilitas biologis serta pola resistensi yang mungkin ditemukan pada isolat klinis (Bonnet dkk, 2020). Pengujian kelayakan agar PRC kedaluwarsa masih terbatas pada penggunaan bakteri α -hemolisis sehingga kemampuan agar PRC kedaluwarsa dalam mengekspresikan jenis hemolisis lain, seperti β -hemolisis atau γ -hemolisis, belum teruji dalam penelitian ini (Miguel dan Pereira, 2024).