

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *Post Test Only With Control Group Design*, yaitu rancangan penelitian di mana pengukuran dilakukan setelah perlakuan diberikan tanpa pengukuran awal (*pretest*) (Notoatmodjo, 2010). Kelompok perlakuan menerima media BAP berbasis *Packed Red Cells* (PRC) donor manusia kedaluwarsa, sedangkan kelompok kontrol menggunakan media BAP darah domba. Hasil pengukuran diameter koloni *Streptococcus mutans* pada kedua kelompok kemudian dibandingkan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pertumbuhan antar kelompok. Struktur rancangan penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain Penelitian

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R Kelompok Eksperimen	X	0 ₁
R Kelompok Kontrol		0 ₂

Sumber: Notoatmodjo, 2010.

Keterangan

- X = Media agar darah PRC (*Packed Red Cells*) donor manusia kedaluwarsa
- 0₁ = Diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media agar darah PRC (*Packed Red Cells*) donor manusia kedaluwarsa
- 0₂ = Diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media agar darah domba

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subyek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diperoleh dari AGAVI Lab, unit laboratorium milik PT Agritama Sinergi Inovasi.

2. Obyek Penelitian

Objek penelitian ini adalah limbah darah donor yang diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI) Kota Yogyakarta. Darah yang digunakan untuk penelitian adalah darah donor PRC (*Packed Red Cells*) yang sudah kedaluwarsa, bergolongan darah A rhesus positif dan tidak hemolisis. Darah donor PRC dijadikan sebagai media agar darah donor manusia kedaluwarsa, serta dalam penelitian ini menggunakan darah domba sebagai pembanding. Darah yang digunakan sebagai objek penelitian berperan sebagai komponen utama media yang mendukung pertumbuhan bakteri.

C. Sampel dan Teknik Sampling

1. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi:

- (1) Koloni yang tumbuh terpisah dari koloni lain dengan jarak minimal 1 cm
- (2) Koloni dengan diameter terbesar pada setiap plate

- (3) Koloni yang menunjukkan morfologi khas *S. mutans* secara makroskopis — bulat kecil, tepi rata, dan permukaan cembung

b. Kriteria Eksklusi:

- (1) Koloni yang tumbuh bergerombol atau berdekatan dengan koloni lain
- (2) Koloni yang morfologinya tidak khas atau diduga kontaminan

2. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *purposive sampling*, yaitu pemilihan sampel berdasarkan kriteria tertentu yang telah ditetapkan sebelumnya (Sugiyono, 2019).

3. Besar Sampel

Penentuan jumlah ulangan dilakukan berdasarkan rumus Federer untuk penelitian eksperimental dengan dua kelompok perlakuan, yaitu:

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

$$(2 - 1)(r - 1) \geq 15$$

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

$$r \geq 16$$

Dengan demikian, jumlah replikasi minimum yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 kali untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan (2 kelompok: Media agar darah PRC (*Packed Red Cells*) donor manusia kedaluwarsa dan BAP darah domba)

r = jumlah ulangan atau replikasi

Berdasarkan perhitungan tersebut, replikasi minimal yang dibutuhkan adalah 16 plate per kelompok. Penelitian ini menggunakan plate per kelompok sehingga telah memenuhi dan melampaui syarat minimal tersebut.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 29 Mei sampai dengan 05 Juni 2026.

2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah media BAP berbasis *Packed Red Cells* (PRC) donor manusia kedaluwarsa sebagai kelompok perlakuan dan media BAP darah domba sebagai kelompok kontrol.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter koloni *Streptococcus mutans* pada masing-masing media setelah inkubasi 48 jam, diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm pada diameter terlebar koloni.

3. Variabel Pengganggu Terkendali

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah teknik penanaman inokulum, kemurniaan bakteri, serta kemungkinan kontaminasi.

F. Definisi Operasional Penelitian

1. Media Agar Darah PRC (*Packed Red Cells*) Donor Manusia Kedaluwarsa

Media agar darah PRC donor manusia kedaluwarsa merupakan media pertumbuhan bakteri yang dibuat dari *Blood Agar Base* yang diperkaya dengan *Packed Red Cells* (PRC) donor manusia kedaluwarsa sebanyak 5%. PRC yang digunakan berasal dari limbah kantong darah PMI yang telah melewati masa simpan transfusi sehingga tidak lagi layak digunakan untuk keperluan klinis.

2. Media agar darah domba

Media agar darah domba merupakan media *Blood Agar Plate* (BAP) yang dibuat dengan menambahkan darah domba steril sebanyak 5% ke dalam *Blood Agar Base* sebagai media dasar. Darah domba diperoleh secara aseptis dan merupakan standar baku dalam pembuatan media agar darah di laboratorium mikrobiologi.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang diperoleh secara langsung melalui rangkaian percobaan di laboratorium. Data dikumpulkan melalui pengukuran diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media BAP *Packed Red Cells* (PRC) donor manusia kedaluwarsa dan media BAP darah domba setelah inkubasi 48 jam menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm. Pengukuran dilakukan pada diameter terlebar koloni secara konsisten pada seluruh sampel di kedua kelompok.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Instrumen
 - a. Ose bulat
 - b. *Disposable plate* (cawan petri)
 - c. Bunsen
 - d. Inkubator
 - e. Tabung reaksi dan rak tabung
 - f. Gelas kimia
 - g. Neraca teknis
 - h. Pipet ukur
 - i. Labu erlenmeyer
 - j. Gelas ukur
 - k. Autokaf
 - l. Oven
 - m. *Ice box*

- n. Jangka sorong
- o. Korek api
- p. *Object glass*

2. Bahan

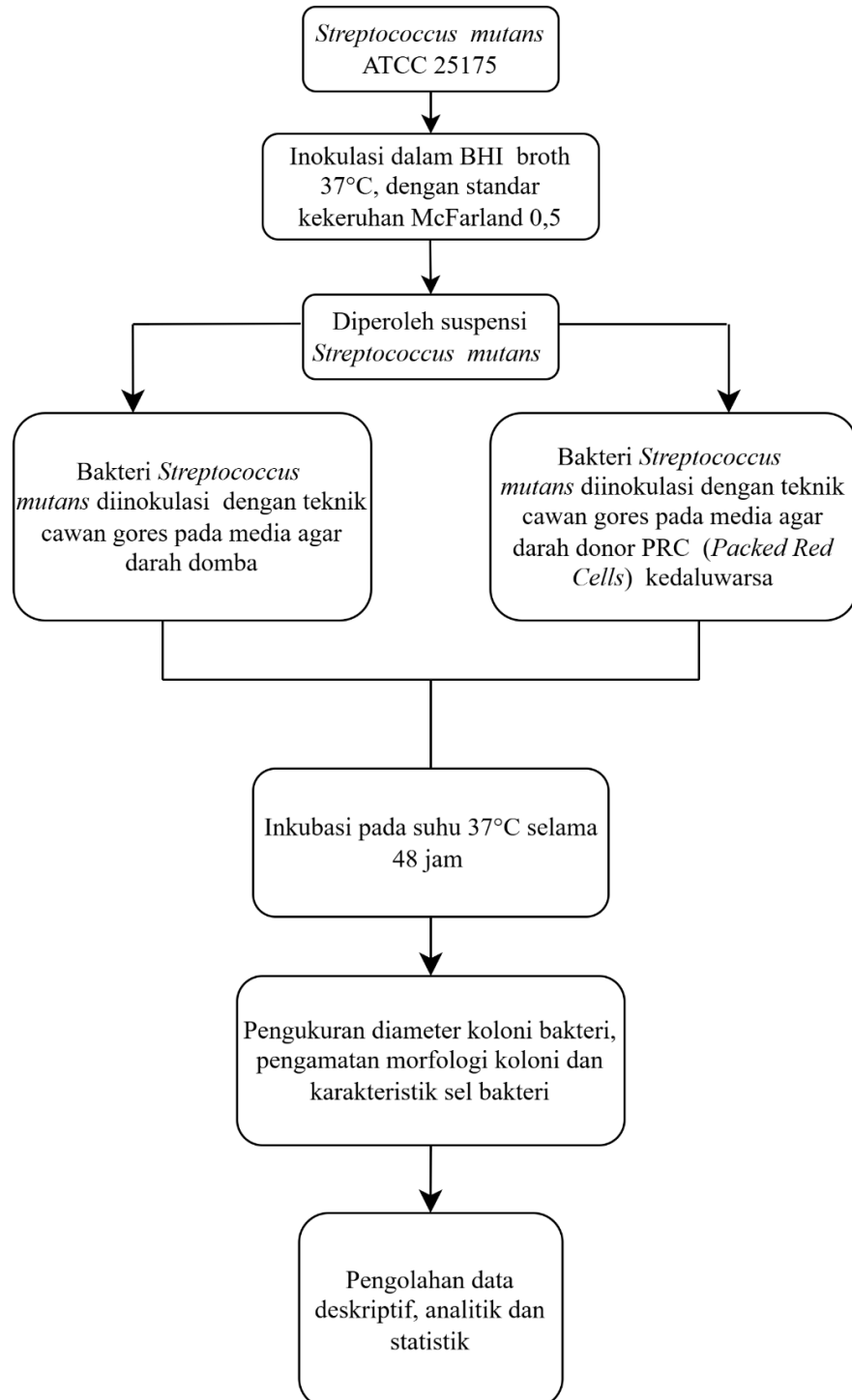
- a. Biakan murni *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- b. Darah domba
- c. Darah donor PRC (*Packed Red Cells*) kedaluwarsa
- d. Serbuk *Blood Agar Base*
- e. Standar McFarland 0,5%
- f. Alkohol 70%
- g. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- h. Pewarna gram

I. Uji Validitas Instrumen

Validitas instrumen pada penelitian ini didasarkan pada penggunaan alat ukur yang telah terstandarisasi secara metrologi. Instrumen yang digunakan untuk mengukur diameter koloni *Streptococcus mutans* adalah jangka sorong berskala milimeter dengan ketelitian 0,01 mm. Jangka sorong dipilih sebagai instrumen pengukuran karena merupakan alat ukur panjang yang telah memenuhi standar metrologi nasional dan mampu mengukur objek berukuran kecil secara langsung dengan tingkat presisi yang tinggi. Instrumen dinyatakan valid karena secara langsung mengukur diameter koloni sebagai variabel yang diteliti, sehingga hasil pengukuran benar-benar mencerminkan besaran yang ingin diketahui dalam penelitian ini.

Reliabilitas pengukuran dipastikan melalui penerapan prosedur pengukuran yang seragam pada seluruh rangkaian percobaan. Pengukuran diameter koloni dilakukan pada diameter terlebar koloni untuk seluruh sampel di kedua kelompok media, yaitu media BAP *Packed Red Cells* (PRC) donor manusia kedaluwarsa dan media BAP darah domba. Konsistensi arah pengukuran ini diterapkan agar data yang diperoleh antar koloni dapat dibandingkan secara setara dan tidak dipengaruhi oleh perbedaan orientasi pengukuran. Seluruh pengukuran dilakukan oleh pengamat yang sama untuk menghindari bias antar pengamat yang dapat memengaruhi konsistensi hasil, sehingga perbedaan nilai antar data benar-benar mencerminkan perbedaan pertumbuhan koloni pada kedua media dan bukan perbedaan teknik pengukuran.

J. Rancangan Penelitian



Gambar 4. Rancangan Penelitian

K. Prosedur Penelitian

1. Pengajuan Kode Etik dan Perizinan

- a. Persiapan semua dokumen yang akan dibutuhkan untuk proses pengajuan izin penelitian dan pengajuan kode etik.
- b. Ketika semua berkas sudah siap, ajukan semua berkas pada komite etik di institusi.
- c. Ketika semua berkas sudah diajukan, tunggu balasan review dari komite etik, apabila terdapat kekeliruan atau kekurangan, segera lengkapi berkas dan ajukan kembali untuk meneruskan penelitian.

2. Pengadaan Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Agavi Lab, unit laboratorium milik PT Agritama Sinergi Inovasi.

3. Pengadaan Darah Manusia Kedaluwarsa

Darah PRC (*Packed Red Cells*) kedaluwarsa diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI) Kota Yogyakarta.

4. Sterilisasi Alat

- a. Disiapkan alat yang akan disterilkan seperti: tabung reaksi, pipet ukur, labu erlenmeyer, ose.
- b. Dicuci alat yang akan digunakan dan dikeringkan
- c. Dibungkus alat tersebut menggunakan kertas dengan rapat
- d. Dimasukkan ke dalam oven lalu susun

5. Pembuatan Media Agar Darah Domba

- a. Penimbangan 24 gram serbuk *Blood Agar Base* dilakukan dan serbuk dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- b. Penambahan 600 ml akuades dilakukan hingga campuran homogen.
- c. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- d. Saat suhu media mencapai $\pm 50^{\circ}\text{C}$, darah domba sebanyak 30 ml ditambahkan untuk memperoleh konsentrasi 5 %.
- e. Media dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 ml dan dibiarkan memadat.
- f. Membungkus media dengan kertas atau plastik dan diberi tanggal pembuatan media.
- g. Media disimpan jika belum segera digunakan di dalam lemari pendingin.

6. Pembuatan Media BAP PRC Donor Kedaluwarsa

- a. Penimbangan 24 gram serbuk *Blood Agar Base* dilakukan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- b. Penambahan 600 ml akuades dilakukan hingga campuran homogen.
- c. Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan plastik, lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

- d. Saat suhu media mencapai $\pm 50^{\circ}\text{C}$, darah sebanyak 30 ml ditambahkan untuk mencapai konsentrasi 5 %.
- e. Media dituangkan secara aseptis ke cawan petri sebanyak ± 20 ml tiap plate.
- f. Media dibiarkan mengeras dan cawan dibalik agar kondensasi tidak menetes ke permukaan agar.

7. Persiapan Suspensi Bakteri

- a. Satu ose biakan murni *Streptococcus mutans* diambil dari kultur aktif
- b. Ose bakteri dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5–10 ml *Brain Heart Infusion* (BHI) broth
- c. Suspensi dicampur dengan mengocok tabung perlahan hingga merata
- d. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan pertumbuhan optimal, lalu distandarisasi kekeruhan suspensi dengan standar McFarland 0,5
- e. Suspensi bakteri siap digunakan untuk penanaman pada media *Blood Agar Plate* (BAP)

8. Inokulasi pada Media BAP PRC Donor Kedaluwarsa dan Media BAP Darah Domba
 - a. Diambil satu ose dari suspensi *Streptococcus mutans* dari BHI
 - b. Letakkan pada satu titik di ujung plate kemudian teknik penggoresan dilakukan menggunakan teknik goresan kuadran atau radial
 - c. Inokulasi dilakukan sebanyak 16 kali pada media BAP PRC donor kedaluwarsa dan BAP darah domba.
 - d. Tutup media BAP kemudian inkubasi selama 48 jam dalam suhu 37°C
9. Pengamatan hasil
 - a. Morfologi koloni *Streptococcus mutans* diamati secara makroskopis pada *Blood Agar Plate* (BAP) PRC donor kedaluwarsa serta darah domba setelah inkubasi 24 jam.
 - b. Karakteristik sel *Streptococcus mutans* diamati secara mikroskopis setelah dilakukan pewarnaan Gram.
 - c. Diameter koloni *Streptococcus mutans* diukur pada *Blood Agar Plate* (BAP) PRC donor kedaluwarsa serta darah domba setelah inkubasi 48 jam
 - d. Seluruh hasil pengamatan dan pengukuran dari 30 ulangan pada setiap perlakuan dicatat sebagai data penelitian.

L. Penyajian Data

Penyajian data dalam penelitian ini dilakukan dengan mengolah seluruh data primer yang diperoleh dari pengukuran diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media agar darah donor PRC kedaluwarsa dan media BAP darah domba setelah inkubasi 48 jam.

1. Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif dilakukan untuk menggambarkan data hasil pengukuran diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media BAP PRC donor manusia kedaluwarsa dan media BAP darah domba setelah inkubasi 48 jam. Analisis ini meliputi perhitungan nilai rerata dan standar deviasi diameter koloni dari masing-masing kelompok untuk memberikan gambaran awal mengenai perbedaan pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada kedua media.

2. Analisis Analitik

Analisis analitik disajikan dalam bentuk diagram batang untuk mempermudah perbandingan rerata diameter koloni antara media agar darah donor PRC kedaluwarsa dengan media agar darah domba.

3. Analisis Statistik

Analisis statistik dihasilkan berupa hasil pengukuran diameter koloni *Streptococcus mutans* pada media BAP PRC donor manusia kedaluwarsa dan media BAP darah domba. Sebelum dilakukan uji beda, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji

Shapiro-Wilk karena jumlah data masing-masing kelompok sebanyak

30 ($n \leq 50$). Data dinyatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $p > 0,05$.

- a. Jika nilai signifikansi $p \geq 0,05$, maka data berdistribusi normal
- b. Jika nilai signifikansi $p < 0,05$, maka data tidak berdistribusi normal

Apabila kedua kelompok data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji homogenitas varian menggunakan Levene's Test. Jika data normal dan varian homogen, uji beda dilakukan menggunakan *Independent Sample t-test*. Apabila salah satu atau kedua kelompok data tidak berdistribusi normal, uji beda dilakukan menggunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney U Test*. Nilai kemaknaan yang digunakan adalah $\alpha = 0,05$, sehingga perbedaan dinyatakan bermakna secara statistik apabila nilai $p < 0,05$.

M. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan izin kelaikan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) yang dibuktikan dengan surat persetujuan etik nomor DP.04.03/e-KPK.1/756/2026. Penelitian dilaksanakan dengan memperhatikan prinsip etika penelitian