

## **PENGARUH KONSENTRASI DARAH DOMBA DAN WAKTU INKUBASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pneumoniae***

*Effect of Sheef Blood Concentration and Incubation Time on The Growth of  
*Streptococcus pneumoniae**

**Mutianingrum Kusumawati<sup>1\*</sup>, Iis Kurniati<sup>2</sup>, Asep Dermawan<sup>3</sup>, Yeni Wahyuni<sup>4</sup>, Irmawanty  
Setiaputri<sup>5</sup>**

<sup>1,2,3,4</sup> Program Studi Sarjana Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik  
Kesehatan Kemenkes Bandung, <sup>5</sup> RS Paru Dr HA Rotinsulu Bandung.  
Email: [mutianafa17@gmail.com](mailto:mutianafa17@gmail.com)

### **ABSTRACT**

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) microscopically is Gram-positive in the form of paired cocci, has a polysaccharide capsule, is pathogenic for causing pneumonia infections, bacteremia, meningitis, and acute otitis media. Examination *S. pneumoniae* growing on enriched media such as blood agar. The purpose of this study was to determine the optimum blood concentration and incubation time for the growth of *S. pneumoniae*. This study used a quasi-experimental method by comparing blood concentrations of 7%, 9% and 12% with the 5% control group which were incubated at 24 hours and 48 hours. Colony number, colony diameter and alpha-hemolysis properties were observed. The data obtained was tested statistically with ANOVA. Results of the study: Overall homogeneity test  $p$  value  $\geq 0.050$ . The results of statistical analysis of differences in the number of *S. pneumoniae* based on concentration and incubation time obtained an  $F$  count of 0.194 and a significance value of 0.900 which was greater than the significance level of 0.050, so it can be concluded that there was no difference in the number of *S. pneumoniae*. The difference in *S. pneumoniae* colony diameter based on concentration and incubation time obtained an  $F$  count of 5.916 and a significance value of 0.002 which is smaller than the 0.050 significance level, which means that it can be concluded that there is a difference in *S. pneumoniae* colony diameter. Conclusion: Based on statistical tests, it shows that the optimum blood concentration for the growth of *S. pneumoniae* is 12%, and the optimum incubation time is 48 hours.

**Key words** : *S. pneumoniae*, blood agar concentration, and incubation time.

### **ABSTRAK**

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) secara mikroskopis Gram positif berbentuk kokus berpasangan, mempunyai kapsul polisakarida, bersifat patogen menyebabkan infeksi pneumonia, bakteremia, meningitis, dan otitis media akut. Pemeriksaan *S. pneumoniae* dengan cara kultur yang tumbuh pada media yang diperkaya seperti agar darah. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi darah dan waktu inkubasi yang optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae*. Penelitian ini menggunakan metode kuasi eksperimen dengan membandingkan konsentrasi darah 7%, 9% dan 12% dengan kelompok kontrol 5% yang diinkubasi pada 24 jam dan 48 jam. Diamati jumlah koloni, diameter koloni dan sifat alfa-hemolisis. Data yang diperoleh diuji statistik dengan ANOVA. Hasil penelitian: Uji homogenitas keseluruhan nilai  $p \geq 0.050$ . Hasil analisis secara statistik perbedaan jumlah *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi diperoleh nilai  $F$  hitung 0,194 dan nilai signifikansi 0,900 lebih besar dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan Jumlah *S. pneumoniae*. Perbedaan diameter koloni *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi diperoleh nilai  $F$  hitung 5,916 dan nilai signifikansi 0,002 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, yang artinya dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan diameter koloni *S. pneumoniae*. Kesimpulan: Berdasarkan uji statistik, menunjukkan bahwa konsentrasi darah yang optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae* adalah 12%, dan waktu inkubasi yang optimum adalah 48 jam.

**Kata kunci:** *S. pneumoniae*, konsentrasi agar darah, dan waktu inkubasi.

## PENDAHULUAN

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) merupakan flora normal saluran pernapasan atas manusia, dan dapat menyebabkan pneumonia, meningitis dan otitis media akut (infeksi telinga tengah). Salah satu penyebab utama kematian anak di seluruh dunia dan bakteri patogen yang menyebabkan pneumonia pada bayi baru lahir dan lansia adalah *S. pneumoniae*.<sup>1,2</sup>

Menurut Profil Kesehatan Indonesia 2021, pneumonia menyerang 278.261 anak balita di Indonesia, dengan angka kematian 444 anak. Pneumonia memiliki risiko kematian 0,16% pada balita. Dibandingkan dengan anak usia 1-4 tahun, angka kematian akibat pneumonia hampir dua kali lebih tinggi pada kelompok bayi baru lahir. Dibandingkan provinsi lain dengan angka prevalensi pneumonia balita (4,24%), Provinsi Jawa Barat memiliki jumlah kasus pneumonia terbanyak kedua di Pulau Jawa (67.185), menurut data Profil Kesehatan Indonesia 2021.<sup>3</sup> Terdapat 41 anak balita yang meninggal akibat pneumonia di Jawa Barat, dengan case fatality rate (CFR) 0,13%.<sup>4</sup> Mengingat tingginya angka kematian<sup>3</sup>.

Agar yang dilengkapi dengan 5% darah adalah media pertumbuhan umum rutin digunakan di laboratorium mikrobiologi klinik untuk identifikasi bakteri patogen<sup>4</sup>. Penambahan darah bertujuan mempersubur perbenihan bakteri yang sukar tumbuh pada perbenihan biasa seperti golongan *Streptococcus* dan bakteri lainnya, di samping itu media ini dapat membedakan sifat-sifat bakteri<sup>5</sup>. *S. pneumoniae* telah dikategorikan sebagai bakteri anaerob aerotolerant karena sifatnya yang selektif dan membutuhkan media yang ditingkatkan dengan suplementasi darah. Perkembangan bakteri ini akan dipercepat dengan penambahan 5–10% CO<sub>2</sub><sup>6</sup>. Bakteri dapat tumbuh dan diamati makroskopis dan mikroskopis tergantung pada berapa lama

diinkubasi; biasanya, periode ini adalah 24 jam. Kultur bakteri yang telah diinkubasi dalam waktu lama atau lebih lama dari yang dibutuhkan bakteri untuk berkembang akan mengubah morfologi. Karena waktu inkubasi yang digunakan cukup lama, bentuk bakteri akan berubah dari bentuk dasarnya secara mikroskopis sehingga sulit diamati.<sup>7</sup>

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fauzia (2018) pertumbuhan *S. pneumoniae* pada Media Agar Darah Manusia dan Preinkubasi dalam *Supplemented Todd Hewitt Broth* (STHB) tidak lebih baik dibandingkan pada Media Agar Darah Domba<sup>8</sup>. Perlu dilakukan penelitian terhadap pengaruh penambahan konsentrasi darah dan lama waktu inkubasi yang optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae*.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimen semu (*Quasi Experimen*) dengan desain penelitian perbandingan kelompok statis (*Static Group Comparison*). yaitu subyek yang mendapat perlakuan, adalah agar base dengan penambahan konsentrasi darah 5%, 7%, 9%, dan 12 % diinkubasi pada kondisi anaerobik dalam waktu 24 jam dan 48 jam dilihat terhadap pertumbuhan *S. pneumoniae*.

Populasi dan sampel yang digunakan adalah darah domba yang dibuat menjadi beberapa konsentrasi kemudian ditambahkan kedalam media Agar base pada saat suhu 45-50°C kemudian dituang kedalam plate hingga memadat. Banyaknya perlakuan pada penelitian ini adalah 8 perlakuan. Banyaknya unit eksperimen dengan menggunakan rumus t (perlakuan) x r (pengulangan) adalah 8 x 5 = 40 unit eksperimen.

Penelitian dilakukan di Instalasi Laboratorium RSP dr. H. A. Rotinsulu Bandung, mulai bulan Maret sampai dengan April 2023. Data yang diperoleh adalah data primer sebagai hasil

pengamatan langsung terhadap pertumbuhan *S. pneumoniae*.

Alat digunakan diantaranya: *Biosafety Cabinet*, inkubator, otoklaf, spiritus, cawan petri, ose bulat, kaca objek, pipet ukur, bulb, Nephelometer, erlenmeyer 250 mL, Erlenmeyer asah 250 mL, tabung duran 200 mL, gelas ukur 100 mL, labu ukur 100 mL timbangan digital, *hot plate*, tabung reaksi, batu didih, rak tabung reaksi, spatula, batang pengaduk, mikropipet, jangka sorong, mikroskop binokuler, jar CO<sub>2</sub>. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: Suspensi *Streptococcus pneumoniae*, agar base, darah domba, aquades, NaCl 0,85%, optochin, pewarna Gram.<sup>9</sup>

Tahapan cara kerja penelitian ini adalah pembuatan Agar Base, Penambahan Larutan Darah 5%, 7%, 9%, dan 12 %, Pembuatan Suspensi *Streptococcus pneumoniae*, Inokulasi *Streptococcus pneumoniae*, pewarnaan Gram (Uji Penegasan), dan Uji Kepekaan Optochin (Uji Penegasan). Data hasil pemeriksaan seluruh sampel dikumpulkan untuk dilihat hasil pertumbuhan (diameter dan jumlah) di medium *agar base* berbagai konsentrasi darah domba kemudian di uji statistik ANOVA<sup>10,11,12</sup>.

## HASIL

Jumlah *S. pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 267 CFU/mL, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 214. Sedangkan dengan waktu inkubasi 48 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 262 CFU/mL, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 196 CFU/mL. (lihat **Tabel 1**)

**Tabel 1. Deskriptif Jumlah *S.pneumoniae***

		Jumlah <i>S. pneumoniae</i> 10 <sup>-5</sup> (CFU/mL)			
Waktu Inkubasi	Pengu- langan	Konsentrasi			
		5%	7%	9%	12%
24 Jam	1	204	241	267	286
	2	234	249	254	276
	3	202	212	221	238
	4	234	249	254	276
	5	195	213	228	258
Rata-rata		214	233	245	267
48 Jam	1	191	246	249	260
	2	231	255	243	255
	3	218	276	286	291
	4	148	166	237	274
	5	191	201	217	229
Rata-rata		196	229	246	262

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

Berdasarkan tabel dibawah (lihat **Tabel 2**) menjelaskan Diameter *S. pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 1,34 mm, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 0,38 mm. Sedangkan dengan waktu inkubasi 48 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 1,98 mm, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 1,4 mm.

**Tabel 2. Deskriptif Diameter *S. Pneumoniae***

		Diameter <i>S. pneumoniae</i> (mm)			
Waktu Inkubasi	Pengu- langan	Konsentrasi			
		5%	7%	9%	12%
24 jam	1	0.1	0.5	0.8	0.7
	2	0.3	0.7	1	1.2
	3	0.5	0.6	1.7	1.9
	4	0.5	0.7	1.1	1.5
	5	0.5	0.9	1.1	1.4
Rata-rata		0.38	0.68	1.14	1.34
48 jam	1	2.1	2.4	2.6	2.6
	2	2.3	2.4	2.3	2.5
	3	1.2	2	2.1	2.1
	4	0.8	0.9	1	1.2
	5	0.6	1.1	1.2	1.5
Rata-rata		1.40	1.76	1.84	1.98

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

Berdasarkan tabel (lihat **Tabel 3**) Diameter Zona Alfa-hemolisis *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 1,92 mm, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 0,84 mm. Sedangkan dengan waktu inkubasi 48 jam yang memiliki nilai rata-rata terbesar dari konsentrasi 12% sebesar 3,4 mm, dan yang memiliki nilai rata-rata terendah dari konsentrasi 5% sebesar 1,76 mm.

**Tabel 3. Deskriptif Diameter Zona Alfa-Hemolisis *S.pneumoniae***

Diameter Zona Alfa-hemolisis <i>S.pneumoniae</i> (mm)		Konsentrasi				
		5%	7%	9%	12%	
Waktu Inkubasi	Pengu- langan	1	0.7	1	1.3	1.5
		2	0.7	1	1.2	1.6
		3	1	1.2	1.9	2.3
		4	0.7	1.1	1.6	2.5
		5	1.1	1.2	1.4	1.7
Rata-rata		0.84	1.10	1.48	1.92	
48 Jam	Pengu- langan	1	2.7	3	3.5	3.7
		2	2.3	3.4	3	3.7
		3	1.4	2.3	2.1	2.3
		4	1.3	1.5	3.2	3.7
		5	1.1	2.2	3.5	3.6
Rata-rata		1.76	2.48	3.06	3.40	

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

## Analisis Hipotesis

### 1. Uji Homogenitas

Tujuan dari uji homogenitas adalah untuk menetapkan apakah sampel penelitian diambil dari suatu populasi dengan varietas yang homogen atau tidak. Peneliti menggunakan parameter nilai probabilitas (sig) sebagai tolok ukur untuk menilai homogenitas ini, dengan catatan bahwa data dikatakan homogen jika nilai probabilitas (sig) lebih besar dari 0,05. Sedangkan data tidak homogen jika nilai probabilitas (sig) lebih kecil dari 0,05.).

Tabel Levene's Test of Equality of Error Variances, yang didasarkan pada data tabel (lihat Tabel 4), menunjukkan bahwa terdapat varians yang sama ketika nilai signifikansi atau probabilitas (P) memiliki nilai lebih kecil dari 0,050. Temuan studi Levene's of Error Variances menunjukkan nilai F sebesar 1.700. Dalam hal derajat kebebasan (df), df 1 menunjukkan nilai 1, sedangkan df 2 menunjukkan nilai 38. Nilai sig., yang merupakan nilai probabilitas (P) dari semua variabel tergantung pada konsentrasi, adalah 0,802 , 0,947, 0,06, 0,373, 0,839, dan 0,227 masing-masing untuk kelompok kontrol dan eksperimen. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi homogenitas didukung oleh hasil keseluruhan P 0,050. Ada kemiripan, seperti yang ditunjukkan oleh nilai P..

**Tabel 4. Hasil Uji Homogenitas**

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kelompok	Jumlah <i>S.pneumonia</i>	0.064	1	38	0.802
	Tabel Diameter <i>S.pneumonia</i>	0.004	1	38	0.947
	Tabel Diameter Zona Alfa- hemolisis <i>S.pneumonia</i>	3.761	1	38	0.060
	Jumlah <i>S.pneumonia</i>	1.073	3	36	0.373
Konsentrasi	Tabel Diameter <i>S.pneumonia</i>	0.281	3	36	0.839
	Tabel Diameter Zona Alfa- hemolisis <i>S.pneumonia</i>	1.517	3	36	0.227

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

### 2. Pengujian Hipotesis

Setelah asumsi homogenitas sudah terpenuhi, dalam penelitian ini terdiri dari analisis uji hipotesis *One Way Anova* dan uji hipotesis *Two Way Anova*. Uji *One Way Anova* dan uji *Two*

Way Anova merupakan analisis untuk mengetahui perbedaan rata-rata didalam satu kelompok, dan perbandingan antara beberapa kelompok. Dalam penelitian ini analisis tersebut digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata Jumlah *S. pneumoniae*, diameter *S. pneumoniae*, dan diameter zona alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi 5%, 7%, 9%, 12%, dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam. Berikut ini adalah kriteria dari uji *One Way Anova* dan uji *Two Way Anova*:

- 1) Jika nilai probabilitas atau signifikansi lebih besar dari taraf signifikansi 0,050 dan nilai F hitung lebih kecil dari F tabel, maka dapat dikatakan data tidak memiliki perbedaan yang bermakna atau tidak signifikan.
- 2) Jika nilai kemungkinan atau signifikansi di bawah tingkat signifikansi 0,050 dan nilai F estimasi melebihi F tabel, maka dapat dikatakan data memiliki perbedaan yang bermakna atau signifikan.

**a) Uji One Way Anova**

Berdasarkan data tabel dibawah (lihat **Tabel 5**) menunjukkan bahwa nilai Sig. dari variabel Jumlah *S. pneumoniae*, Diameter *S. pneumoniae*, dan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* sebesar 0,000, 0,030, dan 0,007. Rata-rata kelas eksperimen lebih tinggi daripada kelas kontrol. Karena nilai Sig. 0,05 yang menunjukkan bahwa rata-rata perbedaan antar variabel berbeda secara signifikan, maka dapat dinyatakan bahwa hipotesis diterima. Jumlah *S. pneumoniae*, Diameter *S. pneumoniae*, dan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* di dalam kelompok kontrol dan eksperimen.

**Tabel 5. Hasil One Way Anova Berdasarkan Kelompok Kontrol dan Eksperimen**

ANOVA				
		F	Sig.	Kesimpulan
Kelompok	Jumlah <i>S. pneumoniae</i>	17.426	0.000	Ha Diterima
	Tabel Diameter <i>S. pneumoniae</i>	5.067	0.030	Ha Diterima
	Tabel Diameter Zona Alfa-hemolisis <i>S. pneumoniae</i>	8.205	0.007	Ha Diterima

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

Data tabel dibawah (lihat **Tabel 6**) menunjukkan bahwa nilai Sig. dari variabel Jumlah *S. pneumoniae*, Diameter *S. pneumoniae*, dan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* sebesar 0,000, 0,085, dan 0,008. Kelas eksperimen memiliki *mean* lebih besar daripada kelas kontrol. Hal ini dapat disimpulkan bahwa Hipotesa diterima karena nilai Sig. < 0,05 artinya terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara variabel Jumlah *S. pneumoniae*, dan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* didalam kelompok konsentrasi. Sedangkan variabel diameter *S. pneumoniae*, memiliki nilai Sig. sebesar 0,085 > 0,05 yang artinya tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara variabel diameter *S. pneumoniae* didalam kelompok konsentrasi.

**Tabel 6. Hasil One Way Anova Berdasarkan Konsentrasi**

ANOVA				
		F	Sig.	Kesimpulan
Konsentrasi	Jumlah <i>S. pneumoniae</i>	9.728	0.000	Ha Diterima
	Tabel Diameter <i>S. pneumoniae</i>	2.384	0.085	Ha Ditolak
	Tabel Diameter Zona Alfa-hemolisis <i>S. pneumoniae</i>	4.652	0.008	Ha Diterima

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 7. Hasil Analisis Two Way Anova Jumlah *S. Pneumoniae***

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Jumlah <i>S. pneumonia</i>					
		Rata-rata	F	Sig.	Kesimpulan
Konsentrasi	Inkubasi 24 Jam	239.95	9.001	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	232.80			
Waktu Inkubasi	Konsentrasi 5%	204.80	0.729	0.399	Ha Ditolak
	Konsentrasi 7%	230.80			
	Konsentrasi 9%	245.60			
	Konsentrasi 12%	264.30			
Interaksi Konsentrasi dan Waktu Inkubasi					
Konsentrasi 5 %	Inkubasi 24 Jam	213.80	0.194	0.900	Ha Ditolak
	Inkubasi 48 Jam	195.80			
Konsentrasi 7 %	Inkubasi 24 Jam	232.80	0.194	0.900	Ha Ditolak
	Inkubasi 48 Jam	228.80			
Konsentrasi 9 %	Inkubasi 24 Jam	246.40	0.194	0.900	Ha Ditolak
	Inkubasi 48 Jam	244.80			
Konsentrasi 12 %	Inkubasi 24 Jam	266.80	0.194	0.900	Ha Ditolak
	Inkubasi 48 Jam	261.80			

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 8. Hasil Analisis Two Way Anova Diameter *S.pneumoniae***

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Diameter <i>S. pneumonia</i>					
		Rata-rata	F	Sig.	Kesimpulan
Konsentrasi	Inkubasi 24 Jam	1.06	3.887	0.018	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.57			
Waktu Inkubasi	Konsentrasi 5 %	0.89	8.938	0.005	Ha Diterima
	Konsentrasi 7 %	1.22			
	Konsentrasi 9 %	1.49			
	Konsentrasi 12 %	1.66			
Interaksi Konsentrasi dan Waktu Inkubasi					
Konsentrasi 5%	Inkubasi 24 Jam	0.38	5.916	0.002	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.40			
Konsentrasi 7%	Inkubasi 24 Jam	0.68	5.916	0.002	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.76			
Konsentrasi 9%	Inkubasi 24 Jam	1.84	5.916	0.002	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.14			
Konsentrasi 12%	Inkubasi 24 Jam	1.34	5.916	0.002	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.98			

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 9. Hasil Analisis Two Way Anova Diameter Zona Alfa-Hemolisis *S. Pneumoniae***

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Diameter Zona alfa-hemolisis <i>S.pneumonia</i>					
		Rata-rata	F	Sig.	Kesimpulan
Konsentrasi	Inkubasi 24 Jam	1.73	13.398	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	2.28			
Waktu Inkubasi	Konsentrasi 5 %	1.30	11.663	0.002	Ha Diterima
	Konsentrasi 7 %	1.79			
	Konsentrasi 9 %	2.27			
	Konsentrasi 12 %	2.66			
Interaksi Konsentrasi dan Waktu Inkubasi					
Konsentrasi 5%	Inkubasi 24 Jam	0.84	20.008	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.76			
Konsentrasi 7%	Inkubasi 24 Jam	1.10	20.008	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	2.48			
Konsentrasi 9%	Inkubasi 24 Jam	3.06	20.008	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	1.48			
Konsentrasi 12%	Inkubasi 24 Jam	1.92	20.008	0.000	Ha Diterima
	Inkubasi 48 Jam	3.40			

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 10. Hasil Analisis Post Hoc *S. Pneumoniae***

Multiple Comparisons						
Dependent Variable : Jumlah <i>S. pneumonia</i>						
Tukey HSD						
(I) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	7%	-26.00	11.841	0.146	-58.08	6.08
	9%	-40.80*	11.841	<b>0.008</b>	-72.88	-8.72
	12%	-59.50*	11.841	<b>0.000</b>	-91.58	-27.42
7%	5%	26.00	11.841	0.146	-6.08	58.08
	9%	-14.80	11.841	0.601	-46.88	17.28
	12%	-33.50*	11.841	<b>0.038</b>	-65.58	-1.42
9%	5%	40.80*	11.841	<b>0.008</b>	8.72	72.88
	7%	14.80	11.841	0.601	-17.28	46.88
	12%	-18.70	11.841	0.404	-50.78	13.38
12%	5%	59.50*	11.841	<b>0.000</b>	27.42	91.58
	7%	33.50*	11.841	<b>0.038</b>	1.42	65.58
	9%	18.70	11.841	0.404	-13.38	50.78

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 701.025.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 11. Hasil Analisis Post Hoc Diameter *S. pneumoniae***

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Diameter *S. pneumonia*

Tukey HSD

(I) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	7%	-0.330	0.2412	0.528	-0.984	0.324
	9%	-0.600	0.2412	0.081	-1.254	0.054
	12%	-.770*	0.2412	<b>0.016</b>	-1.424	-0.116
7%	5%	0.330	0.2412	0.528	-0.324	0.984
	9%	-0.270	0.2412	0.681	-0.924	0.384
	12%	-0.440	0.2412	0.281	-1.094	0.214
9%	5%	0.600	0.2412	0.081	-0.054	1.254
	7%	0.270	0.2412	0.681	-0.384	0.924
	12%	-0.170	0.2412	0.894	-0.824	0.484
12%	5%	.770*	0.2412	<b>0.016</b>	0.116	1.424
	7%	0.440	0.2412	0.281	-0.214	1.094
	9%	0.170	0.2412	0.894	-0.484	0.824

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .291.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0

**Tabel 12. Hasil Analisis *Post Hoc* Diameter Zona Alfa-hemolisis *S.pneumoniae***

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Diameter Zona Alfa-hemolisis *S.pneumonia*

Tukey HSD

(I) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	7%	-0.490	0.2278	0.159	-1.107	0.127
	9%	-.970*	0.2278	<b>0.001</b>	-1.587	-0.353
	12%	-1.360*	0.2278	<b>0.000</b>	-1.977	-0.743
7%	5%	0.490	0.2278	0.159	-0.127	1.107
	9%	-0.480	0.2278	0.172	-1.097	0.137
	12%	-.870*	0.2278	<b>0.003</b>	-1.487	-0.253
9%	5%	.970*	0.2278	<b>0.001</b>	0.353	1.587
	7%	0.480	0.2278	0.172	-0.137	1.097
	12%	-0.390	0.2278	0.334	-1.007	0.227
12%	5%	1.360*	0.2278	<b>0.000</b>	0.743	1.977
	7%	.870*	0.2278	<b>0.003</b>	0.253	1.487
	9%	0.390	0.2278	0.334	-0.227	1.007

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = .259.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

Sumber: Hasil analisa menggunakan SPSS 25.0



#### b) Uji *Two Way Anova*

Tabel di atas (lihat **Tabel 7**) menunjukkan berdasarkan tabel hasil uji *Two Way Anova* tentang perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam memiliki nilai rata-rata sebesar 239,95 lebih besar dari nilai Jumlah *S. pneumoniae* dengan waktu inkubasi 48 jam sebesar 232,80 dengan selisih 7,15. Hal ini menunjukkan bahwa Jumlah *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam lebih tinggi dibanding waktu inkubasi 48 jam. Hasil analisis secara statistik perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 9,001 dan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi. Sedangkan jumlah *S.pneumoniae* dengan konsentrasi 12% memiliki nilai rata-rata tertinggi sebesar 264,30. Hasil analisis secara statistik perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi diperoleh nilai F hitung 0,729 dan nilai signifikansi 0,399 lebih besar dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* yang berdasarkan konsentrasi.

Hasil analisis secara statistik perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 0,194 dan nilai signifikansi 0,900 lebih besar dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi. Dengan demikian **Hipotesa Pertama ditolak** yaitu tidak ada perbedaan Jumlah *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi.

Pada tabel di atas (lihat **Tabel 8**) menunjukkan berdasarkan tabel hasil uji *Two Way Anova* tentang perbedaan Diameter *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam memiliki nilai rata-rata

sebesar 1,06 lebih kecil dari nilai Diameter *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 48 jam sebesar 1,57 dengan selisih 0,51. Hal ini menunjukkan bahwa Diameter *S.pneumoniae* dengan waktu inkubasi 48 jam lebih tinggi dibanding waktu inkubasi 24 jam. Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 3,877 dan nilai signifikansi 0,018 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi.

Sedangkan pada Diameter *S.pneumoniae* dengan konsentrasi 12% memiliki nilai rata-rata tertinggi sebesar 1,66. Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi diperoleh nilai F hitung 8,938 dan nilai signifikansi 0,005 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi.

Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 5,916 dan nilai signifikansi 0,002 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi. Dengan demikian **Hipotesa Kedua diterima** yaitu ada perbedaan signifikan Diameter *S.pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi.

Tabel di atas (lihat **Tabel 9**) menunjukkan berdasarkan tabel hasil uji *Two Way Anova* tentang perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* dengan waktu inkubasi 24 jam memiliki nilai rata-rata sebesar 1,73 lebih kecil dari nilai Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* dengan waktu inkubasi 48 jam sebesar 2,28 dengan selisih 0,55. Hal ini menunjukkan bahwa Diameter Zona Alfa-hemolisis *S.*

*pneumoniae* dengan waktu inkubasi 48 jam lebih tinggi dibanding waktu inkubasi 24 jam. Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 13,398 dan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi.

Sedangkan Diameter *S. pneumoniae* dengan konsentrasi 12% memiliki nilai rata-rata tertinggi sebesar 2,66. Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi diperoleh nilai F hitung 11,663 dan nilai signifikansi 0,002 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi.

Hasil analisis secara statistik perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi diperoleh nilai F hitung 20,008 dan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi. Dengan demikian **Hipotesa Ketiga diterima** yaitu ada perbedaan signifikan Diameter Zona Alfa-hemolisis *S. pneumoniae* berdasarkan konsentrasi dan waktu inkubasi.

### c) Uji Post Hoc

Terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok konsentrasi jika nilai Sig. 0,05, atau jika terdapat nilai bintang (\*) pada mean difference yang menunjukkan perbedaan yang signifikan. Melalui uji Post-Hoc diketahui bahwa perbedaan antar kelompok signifikan dengan cara-cara berikut

berdasarkan tabel di atas (lihat Tabel 4.10):

- 1) Jumlah *S. pneumoniae* dengan Konsentrasi 5% dengan konsentrasi 9% dan 12%.
- 2) Jumlah *S. pneumoniae* dengan Konsentrasi 7% dengan konsentrasi 12%.
- 3) Jumlah *S. pneumoniae* dengan Konsentrasi 9% dengan konsentrasi 5%.

Jika nilai Sig. < 0,05 maka terdapat perbedaan signifikan antar kelompok konsentrasi atau dengan melihat *Mean difference* jika terdapat nilai bintang (\*) maka terdapat perbedaan yang signifikan. Berdasarkan tabel diatas (lihat **Tabel 11**) melalui uji *Post-Hoc* diketahui perbedaan antar kelompok signifikan adalah hanya Diameter *S. pneumoniae* antara konsentrasi 5% dengan konsentrasi 12 % saja yang terdapat perbedaan yang signifikan.

Jika nilai Sig. < 0,05 maka terdapat perbedaan signifikan antar kelompok konsentrasi atau dengan melihat *Mean difference* jika terdapat nilai bintang (\*) maka terdapat perbedaan yang signifikan. Berdasarkan tabel di atas (lihat **Tabel 12**) melalui uji *Post-Hoc* diketahui perbedaan antar kelompok signifikan sebagai berikut:

- 1) Diameter Zona Alfa-hemolisis *S.pneumoniae* dengan Konsentrasi 5% dengan konsentrasi 9% dan 12%.
- 2) Jumlah *S.pneumoniae* dengan Konsentrasi 7% dengan konsentrasi 12%.
- 3) Jumlah *S.pneumoniae* dengan Konsentrasi 9% dengan konsentrasi 5%.

## PEMBAHASAN

### 1. Alfa-hemolisis

Alfa-hemolisis adalah salah satu jenis hemolisis, yaitu pemecahan sel darah merah oleh bakteri yang menghasilkan enzim hemolisin<sup>13</sup>. Namun, pada alfa-hemolisis, enzim

hemolisin hanya mampu memecah sebagian sel darah merah sehingga menyebabkan zona hijau kecoklatan di sekitar koloni bakteri pada media darah yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri<sup>5</sup>.

*S.pneumoniae* menghasilkan zona kehijauan pada pelat agar darah yang disebut alfa-hemolisis. Fenotipe ini digunakan oleh laboratorium mikrobiologi klinis untuk melaporkan temuan kultur *Streptokokus alfa-hemolitik*, termasuk *S. pneumoniae*, dan bakteri lainnya. Zona alfa-hemolisis pada pelat agar darah telah dikaitkan dengan aktivitas hemolitik pneumolysin pneumokokus (Ply) atau, pada tingkat yang lebih rendah, dengan lisis eritrosit oleh *S. pneumoniae* menghasilkan hidrogen peroksida. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh McDevit(2020) menunjukkan bahwa apa yang disebut zona alfa-hemolisis disebabkan oleh oksidasi oksi-hemoglobin ( $Fe^{2+}$ ) menjadi met-hemoglobin yang tidak mengikat oksigen ( $Fe^{3+}$ ) oleh hidrogen peroksida yang diproduksi *S.pneumoniae* <sup>5</sup>.

## 2. Defibrinasi

Defibrinasi adalah proses penghilangan fibrin dari darah atau jaringan tubuh. Fibrin adalah protein yang terlibat dalam pembekuan darah dan membentuk bekuan darah. Darah domba didefibrinasi dengan memutarnya secara manual berkali-kali dalam parell kaca berleher panjang sampai fibrin dilepaskan dari eritrosit. Selain prosedur ini, antikoagulan seperti sitrat fosfat dekstrosa (CPD) biasanya ditambahkan saat menggunakan darah domba untuk membuat AD. Menurut penelitian, sifat CPD ini sangat berbahaya karena dapat mencegah pertumbuhan bakteri yang dikultur dengan sengaja di AD yang mengandung CPD<sup>9</sup>.

Pengambilan darah domba untuk pembuatan media yaitu *clearance check* untuk meyakinkan bahwa alat dan bahan sebelumnya sudah bersih serta

alat dan bahan yang akan dipakai sudah siap. Disiapkan domba normal dewasa, ditimbang berat badannya (40-70Kg) dan diperiksa status klinisnya. Domba dapat diambil darahnya bila secara klinis sehat. Disiapkan Bleeding Set yang sudah disterilisasi (Tabung Erlenmayer + Selang Berujung Syringe + Filter 0,2  $\mu$  + barrel atau alat pengumpul darah ) atau *blood bag*. *Handling dan restraint* domba untuk *bleeding* di restrainer domba. Rambut domba disekitar vena jugularis bagian bawah dicukur. Daerah vena jugularis yang sudah dicukur tersebut diusap dengan kapas alkohol 70%, kemudian diusap dengan kapas beriodine tincture. Sambil menunggu hingga mencapai volume yang dikehendaki, dikocok tabung *Erlenmeyer* searah putaran jarum jam atau berlawanan arah dengan putaran jarum jam untuk menghindari penggumpalan. Setelah volume mencukupi, tekan daerah tusukan jarum, kemudian dicabut jarum secara perlahan, ditekuk selang dan klem dengan *Artery Clamp*, kemudian diteruskan pengocokan hingga sekitar 15-20 menit. Ditransfer darah ke Ruang Laboratorium untuk proses selanjutnya. Ditutup luka tusukan jarum *Syringe* dengan *Agrave*, kemudian spray dengan *iodine tincture*. Domba dikembalikan ke tempat semula atau kandangnya.

## 3. Konsentrasi darah domba yang optimum untuk pertumbuhan *S.pneumoniae*

Berdasarkan dari hasil analisa uji statistik SPSS *one way anova* terdapat perbedaan pertumbuhan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa Hipotesa diterima karena nilai Sig. < 0,05 yang artinya terdapat perbedaan rata-rata antara variabel konsentrasi darah domba 5%, 7%, 9%, dan 12% yang diteliti berdasarkan Jumlah koloni yang tumbuh, Diameter koloni, dan Diameter Zona alfa-hemolisis *S. pneumoniae*, berdasarkan uji statistik *two-way anova* konsentrasi 12 % memiliki nilai rerata

yang lebih tinggi untuk jumlah, diameter, dan zona alfa-hemolisis.

Darah domba merupakan bahan baku yang standar untuk pembuatan media agar darah, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dengan penambahan konsentrasi darah domba yang paling optimum untuk melihat pertumbuhan *S. pneumoniae*. Darah domba yang diperoleh dengan *venipuncture* jugularis antikoagulan dengan defibrinasi. Proses defibrinasi terkontrol ini meminimalkan setiap degradasi eritrosit terlepas dari hewan domba. Setelah ini selesai, kantong darah kemudian dibawa dari peternakan ke fasilitas produksi untuk disiapkan untuk pengumpulan dan pengeluaran batch darah akhir. PCV untuk darah domba adalah 30-40%.

#### **4. Lama waktu inkubasi yang optimum terhadap pertumbuhan *S.pneumoniae***

Berdasarkan hasil analisis menggunakan SPSS uji *Two way Anova* 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050, terdapat perbedaan untuk pertumbuhan *S. pneumoniae* berdasarkan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam. Inkubasi 24 jam memiliki jumlah koloni sedikit yang lebih banyak dari 48 jam, sedangkan untuk diameter dan zona alfa-hemolisis inkubasi 48 jam memiliki rerata yang lebih tinggi dari pada yang 24 jam. Inkubasi 48 jam yang paling optimal untuk pertumbuhan *S. pneumoniae*.

#### **5. Pengaruh perbedaan konsentrasi darah domba dan lama waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *S. pneumoniae*.**

Berdasarkan analisis data secara statistik SPSS uji *Two way Anova* dengan nilai signifikan < 0,05 interaksi antara konsentrasi dan waktu inkubasi terdapat perbedaan pada pertumbuhan *S. pneumoniae*, diameter koloni nilai signifikansi 0,002 dan zona alfa-hemolisis nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,050,

antara kontrol konsentrasi darah domba 5% dengan kelompok eksperimen konsentrasi 7% , 9% , dan 12%. Sedangkan untuk jumlah koloni pada uji post hoc nilai Sig. < 0,05 terdapat perbedaan jumlah koloni antara kontrol konsentrasi darah domba 5% dengan kelompok eksperimen konsentrasi 7%, 9%, dan 12%.

Penelitian yang dilakukan (McDevitt,2020). mengemukakan bahwa Enzim piruvat oksidase (SpxB), yang diproduksi selama metabolisme aerobik *S. pneumoniae*, menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tiga parameter, salah satunya penambahan katalase secara kimiawi pada media, memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap kelangsungan hidup *S. pneumoniae* memanjang pada fase diam. Semakin banyak eritrosit yang ada pada agar darah, semakin besar kemungkinan enzim katalase akan hadir untuk menetralkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan oleh metabolisme aerobik *S. pneumoniae*, menghasilkan koloni yang lebih besar dan lebih tebal. Diameter rata-rata alfa-hemolisis lebih besar pada 48 jam inkubasi dibandingkan pada 24 jam<sup>5</sup>.

#### **6. Zona Alfa-Hemolisis Optimum**

Zona alfa-hemolisis yang optimum pada agar darah dengan konsentrasi 7% dan 9% terlihat jelas dikelilinginya zona alfa hemolisis berwarna kehijauan ini dikarenakan perbedaan dalam kemampuan hemolisis (penghancuran sel darah merah) pada konsentrasi darah yang berbeda. Pada konsentrasi darah 7% dan 9% terlihat secara jelas adanya alfa - hemolisis. Alfa-Hemolisis ini dapat terjadi karena konsentrasi darah yang cukup tinggi untuk menyediakan sumber daya yang cukup bagi bakteri atau zat lain yang terlibat dalam proses hemolisis. Namun, pada konsentrasi darah 12%, alfa-hemolisis kurang terlihat jelas. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi darah tersebut tidak cukup untuk mendukung proses Alfa-hemolisis secara signifikan. Ada ambang batas konsentrasi darah

yang diperlukan agar Alfa -hemolisis terjadi dengan jelas. Menunjukkan bahwa konsentrasi darah tersebut dapat menghambat atau mencegah proses Alfa-hemolisis.<sup>14</sup>

Konsentrasi darah yang sangat tinggi dapat mempengaruhi lingkungan pertumbuhan bakteri atau menghambat aktivitas enzim yang terlibat dalam hemolisis, perlu eksperimen proses hemolisis dengan lebih baik. Faktor-faktor lain, seperti jenis bakteri yang terlibat, jenis darah yang digunakan, dan kondisi eksperimen lainnya, juga dapat mempengaruhi hasil hemolisis<sup>15</sup>.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa konsentrasi darah domba yang optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae* adalah 12 % dan waktu inkubasi yang optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae* adalah 48 jam.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Tóthpál A, Desobry K. Variation of Growth Characteristics of Pneumococcus with Environmental Conditions. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):1-8. doi:10.1186/s12866-019-1671-8
2. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):E45-E67. doi:10.1164/rccm.201908-1581ST
3. Ridza FWN, Sari M. Studi Ekologi Faktor Pejamu, Kondisi Fisik Hunian dan Pneumonia Pada Balita Provinsi Jawa Barat Tahun 2014-2017. *J Kesmas Untika Luwuk Public Heal J.* 2021;12(1):29-40.
4. Yeh E, Pinsky BA. Hair Sheep Blood, Citrated or defibrinated, Fulfills All Requirements of Blood Agar for Diagnostic Microbiology Laboratory Tests. *PLoS One.* 2009;4(7). doi:10.1371/journal.pone.0006141
5. McDevitt E, Khan F. Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* Results in Alpha-hemolysis by Oxidation of Oxy-hemoglobin to Met-hemoglobin. *Am Soc Microbiol.* 2020;5(6):1-7. doi:10.1128/msphere.01117-20
6. Leboffe MJ, Pierce BE. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory.* 4th ed. Morton Publishing; 2011.
7. Adawiyah L, Diarti MW. Lama Waktu Inkubasi Terhadap Morfologi Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae*. *J Kesehat Poltekkes Kemenkes RI Pangkalpinang.* 2019;7(2):36. doi:10.32922/jkp.v7i2.83
8. Fawzia N, Hadi P. Perbandingan Pertumbuhan *Streptococcus Pneumoniae* Pada Media Agar Darah Domba Dengan Agar Darah Manusia Pengaruh Preinkubasi Dalam Suplemented Todd Hewitt Broth (STBH). *Diponegoro Med J (Jurnal Kedokt Diponegoro).* 2018;7(2):711-723.
9. Anand C, Gordon R. Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):591-594. doi:10.1128/jcm.38.2.591-594.2000
10. Buxton R. Blood Agar- Definisi, Komposisi, Cara Pembuatan dan Interpretasi Hasil. *MicrobeHolic.* Published 2020. Accessed April 14, 2023. <https://www.microbeholic.com/>
11. Sujaya IN. *Petunjuk Praktikum Biologi Dasar.* UNUD Press; 2017.
12. Granato PA, Morton V, Morello JA. *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care.* Mc Graw Hill Education; 2019.

13. Casanova C, Küffer M. Re-emergence of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) and Increase of Serotype 23B After Easing of COVID-19 Measures, Switzerland, 2021. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):2202-2204. doi:10.1080/22221751.2021.2000892
14. Cappucino EJG, Welsh C. *Microbiology a Laboratory Manual*. 12th ed. Pearson; 2020.
15. Sarifah. *Pengaruh Konsentrasi Darah Terhadap Kemampuan Hemolisa Kuman Dengan Menggunakan Kuman Kontrol Staphylococcus Aureus Pada Media Agar Darah.*; 2016.