

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancang Bangun Penelitian**

Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *pre post test only group design* dengan melakukan uji perbandingan, yaitu sebelum dan juga sesudah pemberian *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap jumlah koloni bakteri di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **4.2.1 Lokasi penelitian**

Penelitian ini nantinya dilaksanakan di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang dan laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.2.2 Waktu penelitian**

Penelitian ini akan mulai dilaksanakan pada bulan September 2024 sampai dengan Oktober 2024.

#### **4.3 Populasi dan Sampel**

##### **4.3.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh koloni bakteri udara yang berada di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.3.2 Sampel**

Sampel kasus penelitian adalah koloni bakteri udara yang tumbuh pada media *nutrient agar* (NA) di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas

Muhammadiyah Malang sebelum dan sesudah diberi paparan *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*).

#### 4.3.3 Besar sampel

Pada penelitian ini digunakan 16 kelompok sampel dengan media NA, yaitu 4 kelompok kontrol negatif dan 12 kelompok perlakuan sebagai berikut.

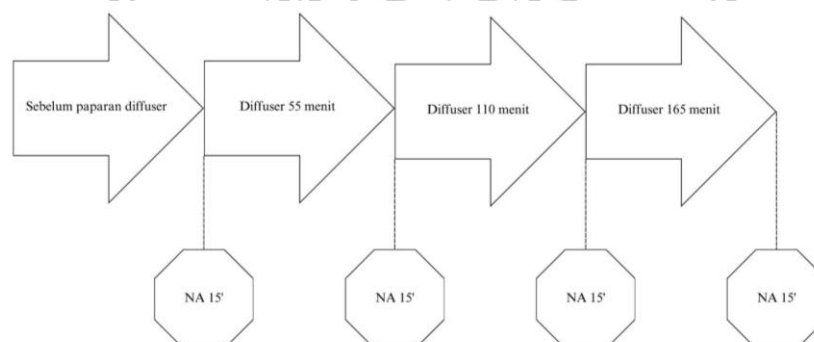
##### a. Kontrol negatif

*Nutrient agar* berjumlah empat *plate* yang dibuka selama 15 menit di ruangan sebelum diberi paparan *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*).

##### b. Kelompok perlakuan

Perlakuan dilakukan dengan cara memberi paparan *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang terdiri dari empat konsentrasi berbeda, yaitu 15%, 20%, 25%, dan 30% dengan variasi waktu paparan 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Media *nutrient agar* akan dibuka selama 15 menit setelah melewati setiap waktu paparan *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*).

Media pertumbuhan mikroba diletakkan pada empat lokasi pada ruang rawat inap kelas III, yaitu di kanan depan, kanan belakang, kiri depan, dan kiri belakang ruangan. Jumlah seluruh sampel yang didapat pada penelitian ini adalah 64 sampel.

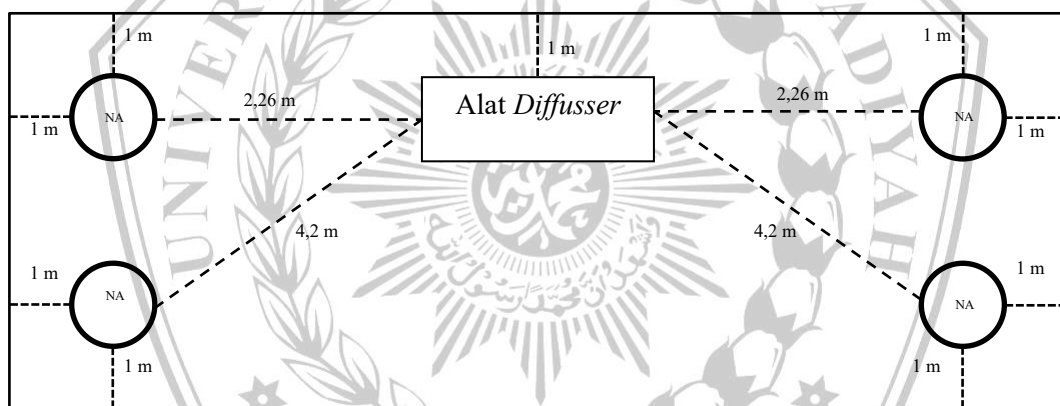


(Rahmanisa *et al.*, 2023)

**Gambar 4.1 Ilustrasi Interval Waktu Pengambilan Sampel Bakteri Udara di Ruang Rawat Inap Kelas III**

#### 4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel dengan *purposive sampling*, yaitu berdasarkan variasi waktu paparan 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Pemilihan lokasi diletakkannya media pertumbuhan bakteri udara, yaitu *nutrient agar* sudah dipertimbangkan dengan dipilih di empat lokasi dalam ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang. Lokasi peletakkan media *nutrient agar* dikonsepsikan dengan pemetaan dalam aspek jarak, letak, dan tinggi peletakkan media agar hasil pertumbuhan bakteri pada media juga merata dan selain itu juga untuk meminimalisir faktor lain yang dapat memengaruhi pertumbuhan koloni bakteri pada media.



**Gambar 4.2 Peta Letak Media *Nutrient Agar* (NA) Dan *Alat Diffuser* Dalam Ruang Rawat Inap Kelas III**

Peletakkan media *nutrient agar* sebagai media tumbuh bakteri udara diletakkan pada empat lokasi di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Universitas Muhammadiyah Malang yang mana memiliki luas  $43m^2$  dengan panjang sisi ruangan  $7,72 \times 5,58$  meter. Media *nutrient agar* nantinya akan diletakkan pada setiap sudut ruangan yang berjumlah empat. Jarak yang digunakan disamakan yaitu memiliki jarak satu meter dengan dinding ruangan. Sedangkan jarak media tumbuh dengan alat *diffuser* diatur dengan jarak yang hampir sama pada keempat

media. Jarak dua media yang sejajar dengan meletakkan *diffuser*, yaitu adalah 2,26 meter dan dua media lainnya adalah 4,2 meter. Penyesuaian jarak tersebut telah diatur dengan prinsip alat *diffuser* berada di tengah ruangan dan memiliki jarak yang hampir sama dengan media *nutrient agar*. Masing-masing media diletakkan dengan jarak satu meter dari lantai ruang rawat inap.

Interval waktu pengambilan sampel dilakukan dengan jarak waktu tiga hari untuk setiap variasi konsentrasi. Waktu interval didasarkan lamanya siklus pertumbuhan bakteri yaitu sekitar 48—72 jam, sehingga ketika menunggu waktu tiga hari tersebut lingkungan pada ruang rawat inap kelas III diharapkan akan sama seperti sebelum diberikan paparan *diffuser* dan kadar aromaterapi yang diberikan sebelumnya sudah tidak ada dalam ruangan tersebut. Sampel koloni udara didapatkan dari hasil pertumbuhan koloni bakteri selama 15 menit saat mulai dibukanya media *nutrient agar*.

#### **4.3.5 Variabel penelitian**

##### **4.3.5.1 Variabel independen**

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu adalah pemberian *diffuser* ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, dan 30% dengan variasi waktu paparan 55 menit, 110 menit, dan 165 menit di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.3.5.2 Variabel dependen**

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu jumlah pertumbuhan bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang setelah dilakukan pemberian paparan *diffuser* daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, dan 30%

serta dengan variasi waktu waktu paparan 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Penghitungan koloni bakteri dengan menggunakan *colony counter*.

#### 4.3.5.3 Variabel perancu

Variabel perancu yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu, intensitas cahaya, dan populasi pada ruang rawat inap kelas III. Suhu nantinya akan diukur menggunakan termometer dengan satuan celcius. Intensitas cahaya menggunakan alat ukur, yaitu *luxmeter* dengan satuan Cd atau Candela. Populasi dalam ruang rawat inap kelas III digunakan sebanyak minimal tiga populasi manusia tetap pada ruang tersebut.



#### 4.3.6 Definisi operasional variabel

**Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Konsentrasi paparan ekstrak daun tanaman jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> )	Digunakan empat jenis konsentrasi ekstrak yang berbeda kadarnya pada larutan <i>diffuser</i> yang digunakan. Dalam larutan <i>diffuser</i> terdiri atas 500 ml aquades sebagai pelarut dan ekstrak daun tanaman jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> ) masing-masing sebesar 15%, 20%, 25%, dan 30%	Persentase konsentrasi essential oil ekstrak daun tanaman jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> )	Hasil ekstraksi metode <i>Microwave Hydrodistillation</i>	Larutan <i>diffuser</i> yaitu sebanyak 500 ml aquades dengan ekstrak daun jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> ) masing-masing sebesar 15%, 20%, 25%, dan 30%	Ordinal
2	Waktu paparan ekstrak daun tanaman jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> )	Digunakan waktu paparan <i>diffuser</i> dengan variasi 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Setelah melewati setiap waktu tersebut media <i>nutrient agar</i> (NA) akan dibuka selama 15 menit. Interval waktu setiap eksperimen berdasarkan variasi yaitu variasi waktu interval menggunakan <i>stopwatch</i> Interval waktu	Variasi waktu interval	<i>Stopwatch</i>	Interval waktu yang digunakan, yaitu pada 55 menit, 110 menit, dan 165 menit.	Ordinal

		yang digunakan, yaitu pada 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Ordinal setelah tiga hari dari penelitian sebelumnya sehingga diharapkan memiliki kondisi lingkungan yang sama seperti sebelum diberikan <i>diffuser</i>				
3	Koloni sebelum dan sesudah diberikan <i>diffuser</i>	Dihitung koloni sebelum dan sesudah diberikan <i>diffuser</i> pada media <i>Nutrient agar</i> (NA) di ruangan rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang	Jumlah koloni yang tumbuh di media NA	<i>Colony counter</i>	Hasil penghitungan jumlah koloni bakteri udara pada media NA sebelum dan sesudah pemberian <i>diffuser</i>	Ordinal
4	Suhu, intensitas cahaya, dan populasi manusia	Dilakukan pengukuran suhu ruang menggunakan termometer dengan satuan celsius, pengukuran cahaya menggunakan luxmeter dengan satuan Cd atau Candela, dan penetapan	Suhu dengan satuan celcius, cahaya dengan satuan Cendela, dan populasi dengan satuan manusia	- Termometer - <i>Luxmeter</i> - Perhitungan manual	Didapatkan hasil ukur dari suhu ruangan, intensitas cahaya ruangan, dan jumlah populasi manusia pada ruang rawat inap kelas III	Ordinal

---

jumlah populasi manusia yang menetap pada ruangan tersebut sebanyak tiga manusia baik pasien maupun penunggu pasien.

---

#### 4.4 Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian eksperimental ini digunakan data primer dengan instrumen observasi *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel bakteri udara dengan media tumbuh NA pada ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang dilakukan sesuai variasi waktu paparan *diffuser* dan variasi ekstrak daun tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan variabel perancu berupa suhu, intensitas cahaya, dan populasi manusia pada ruang rawat inap kelas III tersebut. Kemudian, observasi dilakukan dengan menghitung koloni bakteri udara pada empat media NA sebelum ruangan diberi *diffuser* daun jeruk purut dan empat media NA sesudah ruangan diberikan *diffuser* daun jeruk purut (*Citrus hystrix*).

##### 4.4.1 Alat penelitian

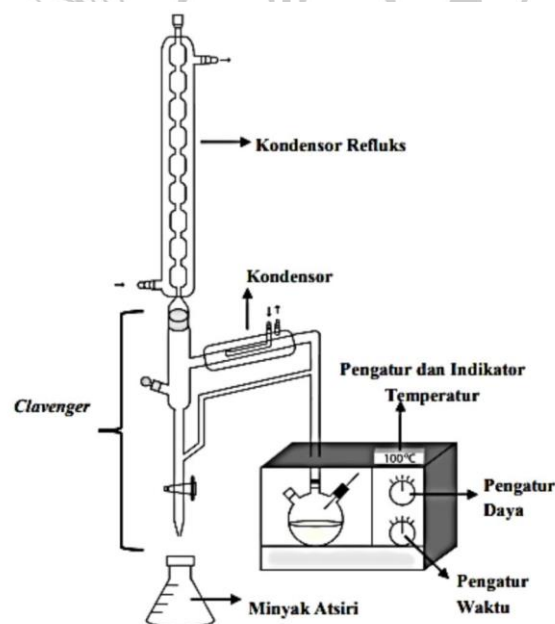
- a. *Diffuser*
- b. Alat pengukur intensitas cahaya dan suhu udara
- c. Termos es
- d. Kertas *aluminium foil*
- e. Inkubator
- f. *Colony counter*
- g. *Handscoon*
- h. Masker

#### 4.4.2 Bahan penelitian

a. *Nutrient agar* (NA)

- Alat
  - *Laminar air flow*
  - Timbangan analitik
  - Cawan petri
  - Autoklaf
  - Oven
  - *Handscoon*
  - Batang pengaduk
- Bahan
  - Pepton 5 gram
  - Dextrose 40 gram
  - Agar-agar 15 gram
  - Antibiotik kloramfenikol
  - Aquades 300 ml
- Langkah kerja
  - Persiapan alat bahan dan menggunakan *handscoon*.
  - Sterilisasi alat yang akan digunakan pada oven dengan suhu 180°C selama satu jam.
  - Dilakukan penimbangan bahan secara tepat menggunakan timbangan digital.
  - Bahan seluruhnya dilarutkan dengan aquades sebanyak 300 ml hingga homogen.

- Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit pada tekanan 1 atmosfer (atm).
- Tunggu hingga larutan turun di suhu  $45^{\circ}\text{—}50^{\circ}\text{C}$  dan dituangkan larutan pada cawan petri.
- b. Minyak atsiri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan variasi ekstrak dalam pelarut aquades, yaitu 15%, 20%, 25%, dan 30%
- Alat
  - Oven
  - *Microwave hydrodistillation* dengan daya 600 Watt
  - Labu destilasi 1 liter
  - Kondensor
  - Corong pemisah
  - Pengatur dan indikator suhu
  - Erlenmeyer (Syarifah, 2017)



(Erliyanti, Priyanto and Pujiastuti, 2020)

**Gambar 4.3 Skema Rangkaian Peralatan  
*Microwave Hydrodistillation***

- Bahan
  - Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) 100 gram
  - Aquades 500 ml
- Langkah Kerja
  - Daun jeruk purut dipotong dengan ukuran  $\pm 2$  cm.
  - Daun jeruk purut yang sudah dipotong akan dimasukkan dalam oven selama empat hari.
  - Kemudian, hasil oven daun jeruk purut ditimbang sebesar 100 gram.
  - Daun jeruk purut yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam tabung atau labu destilasi.
  - Tambahkan aquades sebanyak 500 ml.
  - Dimasukkan labu destilasi dalam *microwave* selama tiga jam pada tekanan satu atmosfer dan temperatur  $\pm 100^{\circ}\text{C}$ .
  - Labu destilasi dalam *microwave* dihubungkan dengan kondensor untuk merubah fase uap menjadi fase cair dengan pendinginan sehingga dihasilkan minyak dan air.
  - Minyak dan air akan masuk pada corong pemisah dan dipisahkan.
  - Minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix*) didapatkan pada erlenmeyer dan disimpan dalam temperatur  $4^{\circ}\text{C}$ .
- c. Koloni bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang

#### 4.5 Prosedur Penelitian

##### a. Sebelum diberikan *diffuser*

Pengambilan sampel koloni bakteri udara pada ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang dengan media NA di cawan petri yang diletakkan terbuka selama 15 menit.

##### b. Pemberian *diffuser*

Ekstrak minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada erlenmeyer yang sudah disimpan dalam suhu 4°C akan dilarutkan dalam 500 ml akuades sesuai kapasitas alat *diffuser* yang digunakan. Minyak atsiri yang digunakan dengan variasi 15%, 20%, 25%, 30% dalam setiap 500 ml akuades. Setelah aquades dan minyak atsiri tercampur dengan rata maka alat *diffuser* dinyalakan dengan pengaturan otomatis pada alat *diffuser* yang akan menyebarkan uap pada udara 35 ml setiap jamnya.

##### c. Setelah diberikan *diffuser*

Ada empat jenis variasi konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dalam 500 ml pelarut aquades, yaitu 15%, 20%, 25%, 30% yang diletakkan pada wadah pengisian *diffuser*. Interval perlakuan paparan *diffuser* dilakukan dengan variasi waktu 55 menit, 110 menit, dan 165 menit. Setiap variasi ekstrak memiliki kesempatan variasi waktu paparan yang sama. Setelah melewati masa paparan setiap variasi waktu, media tumbuh bakteri udara (NA) dibuka di udara selama 15 menit. Perlakuan paparan setiap variasi ekstrak masing-masing dilakukan dalam

satu hari yang sama dengan interval waktu tiga hari diterapkan setelah selesai eksperimen setiap variasi.

- **Pengambilan sampel**

Media pertumbuhan bakteri udara NA yang sudah terbuka selama 15 menit akan ditutup dengan *aluminium foil* dan diletakkan pada termos es dan akan ditransportasikan menuju laboratorium Biomedik FK UMM.

- **Pembiakan**

Media pertumbuhan bakteri udara NA yang berisi sampel koloni bakteri udara dikeluarkan dari termos es dan dibuka dari pembungkus *aluminium foil*. Setelah itu, media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 2 x 24 jam dalam inkubator.

- **Perhitungan jumlah koloni bakteri udara**

Seluruh sampel cawan petri dengan media NA berisi koloni bakteri yang sudah tumbuh setelah inkubasi 2 x 24 jam pada suhu 37°C dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Penghitungan koloni bakteri udara dibandingkan jumlahnya antara sebelum diberikan paparan *diffuser* dengan sampel koloni bakteri udara setelah diberikan paparan *diffuser*.

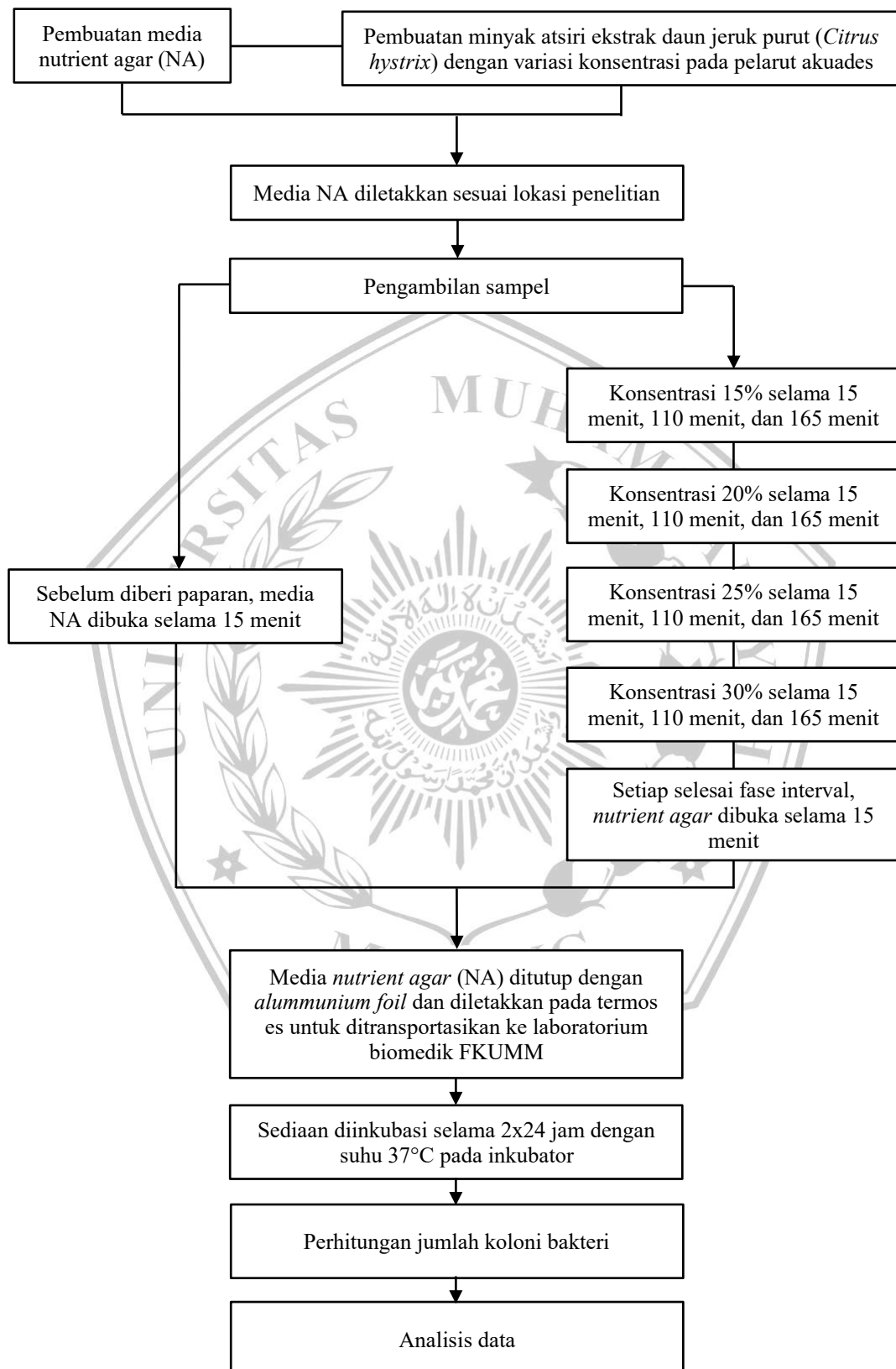
Syarat penghitungan koloni bakteri udara yang tumbuh dalam media adalah sebagai berikut.

- Hitung koloni yang terlihat pada permukaan atas media NA.
- Hitung koloni sebagai satu individu jika didapatkan koloni terpisah dengan baik tidak bertindih.
- Hitung koloni sebagai satu individu jika didapatkan koloni bertindih dan bersinggungan yang memiliki penampakan morfologi, warna, dan bentuk yang berbeda.

- Hitung koloni sebagai satu individu jika didapatkan koloni yang bergabung menjadi satu namun penyusunnya masih bisa dibedakan.
- Penghitungan dilakukan secara manual dengan cara memberi tanda titik pada *colony counter* pada koloni yang telah dihitung. Berdasarkan PERMENKES (2016), penghitungan koloni memiliki satuan CFU/m<sup>3</sup>.



#### 4.6 Alur Penelitian



## 4.7 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan teknik analisis data dengan pengolahannya menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 23 for windows.

### 4.7.1 Uji univariat

Penggunaan uji univariat menggunakan statistik deskriptif hasil berupa gambaran laboratorium tentang jenis bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Muhammadiyah Malang dengan menggunakan pewarnaan

### 4.7.2 Uji bivariat

Penggunaan uji bivariat bertujuan untuk mengetahui perbedaan perlakuan secara keseluruhan terhadap jumlah bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang menggunakan *repeated ANOVA*, dengan didahului uji normalitas data-data penelitian dengan dianalisis menggunakan uji normalitas. Data yang sudah diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* sebab besar sampel yang  $p$  digunakan  $\leq 50$ . Hasil uji ini menunjukkan sebaran data dinilai normal  $P$  jika  $p > 0,05$ . Jika uji normalitas tidak menyimpulkan data normal, perlu dilakukan transformasi data dengan cara sebagai berikut.

$Ln, \log X^2, X^3\sqrt{X}$  dll.

Setelah itu dilanjutkan kembali dengan uji normalitasnya. Jika hasil uji normalitasnya menunjukkan data normal maka dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas. Jika data transformasi tidak normal, uji perbedaan menggunakan *Kruskal Wallis* ditambah *post hoc Mann Withney*.

#### a. Uji homogenitas

Penggunaan uji homogenitas dengan uji varian *Levene' Test* bertujuan untuk mengetahui kehomogenan varian dari data-data yang diperoleh. Varian dinilai homogen jika  $p > 0,05$ .

**b. Uji *repeated* ANOVA**

Apabila didapatkan data terdistribusi normal dan varian datanya homogen, maka selanjutnya pengujian dilakukan dengan analisis varian satu jalur. Tujuan analisis varian dilakukan untuk mengetahui apakah tiap perlakuan memiliki pengaruh pada hasil. Ketika hasil analisis varian diperoleh taraf signifikansi  $< 0,05$  maka memiliki arti terdapat pengaruh berbagai dosis dan waktu pemberian *diffuser* ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*).

**c. Uji *post hoc* jumlah bakteri udara di ruang rawat inap kelas III**

Digunakannya analisis *Post Hoc* bertujuan untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang memiliki perbedaan jumlah koloni bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang setelah pemberian *diffuser* ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Uji *Post-Hoc Bonferroni* digunakan saat varian data dinyatakan homogen dan sama sedangkan *Post-Hoc Tamhane* digunakan jika varian data tidak homogen.

**4.7.3 Uji multivariat**

Uji multivariat dengan menggunakan uji regresi linier sederhana bertujuan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh berdasarkan prediksi dosis *diffuser* ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap jumlah bakteri udara di ruang rawat inap kelas III Rumah Sakit Umum Universitas Muhammadiyah Malang.