BAB IV
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental design* dengan desain penelitian *Posttest only control group design.* Dengan rancangan ini, memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012).

	Perlakuan	*Posstest*
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)		02

Gambar 5. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

R1 : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90%.

R2 : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini yaitu etanol 96%.

X : Perlakuan (Intervensi)

02 : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa.*

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Kimia Dasar Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai bulan Mei 2019.

C. Sampel Penelitian dan Unit analisis

1. Kriteria sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun pandan wangi, dimana kriteria inklusi dari sampel adalah tanaman daun pandan wangi tua, dengan daun dari nomor 1 hingga daun nomor 14 yang dihitung dari akar. Daun berbentuk pita, tipis, licin, ujung runcing, tepi rata, bertulang sejajar dengan panjang 40 – 80 cm, lebar 3 – 5 cm. Sementara kriteria eksklusi yaitu, daun pandan muda, daun pandan tua yang layu atau tidak segar, daun yang berwarna kuning dan berlubang, yang tidak memenuhi pertimbangan dari peneliti. Dalam penelitian ini yang digunakan sebagai sampel yaitu sampel yang memiliki kriteria inklusi.

2. Besar sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak tanaman daun pandan wangi. Ekstrak tanaman daun pandan wangi tersebut dibuat dengan lima konsentrasi yang berbeda yaitu 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96% sehingga diperoleh sampel sebesar 3,5 gram. Pengulangan masing-masing seri konsentrasi dalam penelitian ini dapat ditentukan dengan persamaan berikut :

Keterangan :

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

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$(6 - 1)\ (r - 1) \geq 15$

$5(r - 1) \geq 15$

$5r - 5 \geq 15$

$5r \geq 20$

$r \geq 4$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak 4 kali, sehingga diperoleh 20 data.

3. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi yaitu 50%, 60%, 70%, 80%, 90% terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa.*

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu :

Tempayan (3 buah), blender (Miyako) (1 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), pipet ukur (Pyrex) 1 ml dan 10 ml (2 buah), mikropipet (sororex) dan tip (1 buah), Corong (Pyrex) (1 buah), ball pipet (d & n ball pipet) (1 buah), gelas ukur (Pyrex) 1000 ml (1 buah), Rotary evaporator (1 set), *beaker glass* (Pyrex) 50 ml

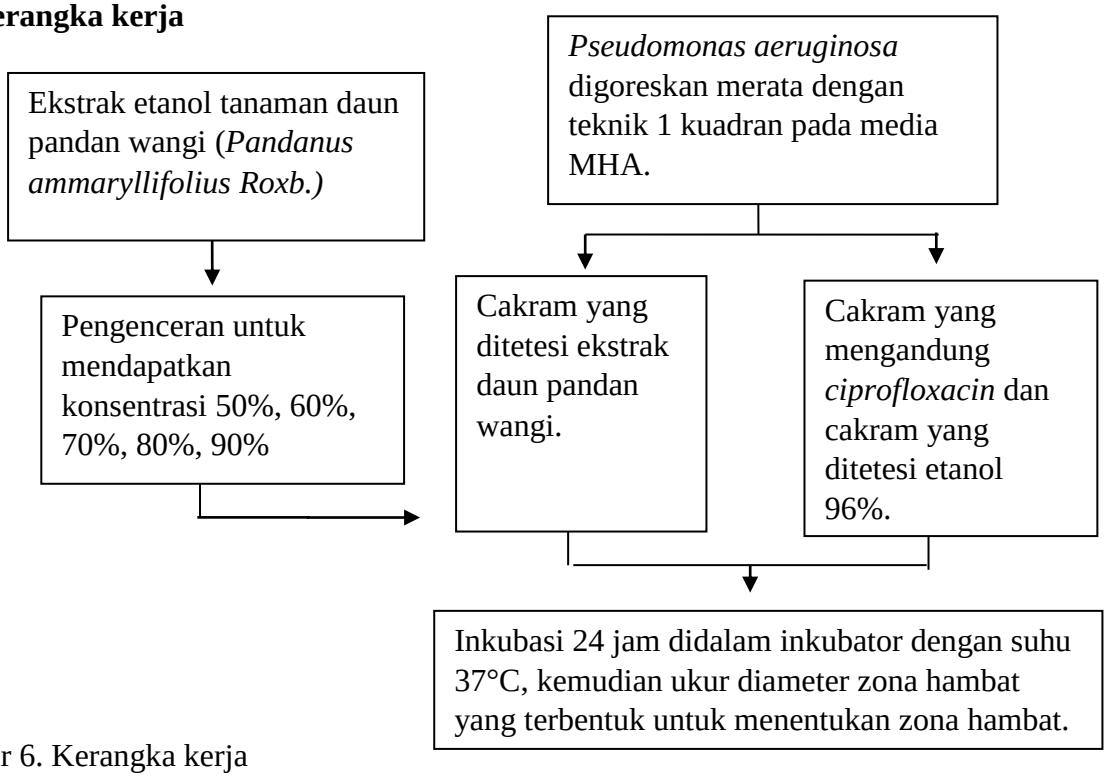
dan 1000 ml (1 buah), spiritus (1 buah), petridish steril (8 buah), tabung reaksi (1 buah), magnetik stsirer (2 buah), Mac Farland densitometer (Biosan), *Autoclave* (Tomy Sx-500) (1 buah), Inkubator (Esco) (1 buah).

2. Bahan

Adapun bahan yang diperlukan yaitu daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.)*, Aquadest steril (Brataco) 1000 ml, ATCC Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, media MHA (oxoid), standar Mac Farland 0,5%, NaCl (Merk) fisiologis 0,9%, cakram kosong (25 buah), cakram antibiotik *ciprofloxacin* (4 buah), kertas saring (3 buah), lidi kapas steril (2 buah), etanol 96% (1000 ml), alumunium foil.

E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 6. Kerangka kerja

2. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

1) Pembuatan simplisia daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*)

a) Daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) dipetik sesuai kebutuhan dan selanjutnya dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir.

b) Daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

c) Daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) dipotong- potong menjadi bagian yang lebih kecil.

d) Daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) dikeringkan dengan cara dijemur ditempat teduh tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering daun pandan wangi diblender dan diayak untuk mendapatkan simplisia berupa serbuk yang halus.

2) Pembuatan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) dengan metode remaserasi

a) Serbuk daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) ditimbang sebanyak 100 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker .

b) Ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak kira-kira 500 ml atau lebih, hingga serbuk daun pandan wangi terendam sempurna, kemudian didiamkan selama 1 minggu dan terlindung dari sinar matahari sambil diaduk dengan stirer magnetik kira-kira 8 jam perhari. Setelah 1 minggu daun pandan wangi disaring dengan kertas saring, kemudian residu dimaserasi kembali dengan cara yang sama pada maserasi pertama, proses ini disebut dengan

remaserasi. Kedua filtrat kemudian ditampung dengan menggunakan erlenmeyer/ botol kaca bersih.

c) Dimasukkan filtrat kedalam alat evaporator, dimana proses ini disebut dengan evaporasi hingga menghasilkan ekstrak daun pandan wangi yang pekat.

d) Hasil ekstraksi daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) yang dihasilkan ditampung dalam wadah yang telah disiapkan.

3) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*)

a) Pembuatan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dengan mengencerkan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) yang telah dibuat dengan rumus pengenceran, dimana pengenceran menggunakan etanol.

Rumus pengenceran yang digunakan yaitu sebagai berikut :

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan rumus :

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak etanol daun pandan wangi (100%)

v : volume pengenceran

b) Jumlah ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah sebagai berikut :

(1) Konsentrasi 50 % dibuat dengan menimbang 0,5 g ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.

(2) Konsentrasi 60% dibuat dengan menimbang 0,6 g ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.

(3) Konsentrasi 70% dibuat dengan menimbang 0,7 g ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.

(4) Konsentrasi 80% dibuat dengan menimbang 0,8 g ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.

(5) Konsentrasi 90 % dibuat dengan menimbang 0,9 g ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.

4) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

a) Ditimbang sebanyak 3,8 g medium dimasukkan kedalam erlenmeyer dan di tambahkan sebanyak 100 ml Aquades (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam satu L aquadest).

b) Medium dipanaskan selama satu menit pada hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna.

c) Masukkan medium ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 1 jam pada suhu 121°C tekanan satu sampai dua atm.

d) Setelah selesai, keluarkan dari autoklaf dan tunggu hingga lumayan dingin ± suhu 40- 45 ^{o}C.

e) Tuangkan ke dalam cawan petri (*Plate*) masing-masing plate sebanyak sebanyak 15 ml.

b. Tahap pemeriksaan

a) Dibuat suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% yang setara dengan 1,5 x 108 (Colony Forming Unit) CFU/ml.

b) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.

c) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga menutup seluruh permukaan media.

d) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.

e) Disiapkan cakram *disk* kosong, kemudian cakram *disk* ditetesi dengan 20 µl masing-masing konsentrasi ekstrak duaun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram *disk.* Diteteskan juga 20 µl etanol 96% sebagai kontrol negatif pada *cakram disk* kosong.

f) Masing-masing cakram yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb.*) kemudian ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah digoreskan suspensi bakteri dan

sedikit ditekan dengan pinset sampai melekat sempurna. Kontrol negatif juga diletakkan pada permukaan media tersebut.

g) Digunakan juga cakram antibiotik *ciprofloxacin* sebagai kontrol kerja, yang ditempelkan pada media MHA.

h) Atur jarak cakram kira-kira 15 mm antara cakram yang lainnya.

i) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C.

j) Setelah diinkubasi diukur zona bening yang terbentuk dengan jangka sorong.

c. Pelaporan hasil

Hasil dilaporkan dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi dengan menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan mm.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan adalah data primer. Data primer adalah suatu data yang diperoleh secara langsung yang dilakukan oleh peneliti (Harnovinsah, 2012). Dalam penelitian ini data primer tersebut meliputi data zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus ammaryllifolius Roxb).*

2. Teknik pengumpulan data

Dalam penelitian ini teknik pengumpulan data yang digunakan adalah dengan pemeriksaan laboratorium menggunakan metode difusi cara *Kirby-Bauer* (cakram).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen perbedaan zona hambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang dinyatakan dalam satuan mm (milimeter) yang diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating dan naratif.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer (software), dengan tahapan sebagai berikut :

a. Uji kolmogorov smirnow

Uji ini digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak. Bila $p > 0,05$ maka data berdistribusi normal dan dilanjutkan dengan uji anova. Bila $p < 0,05$ maka data berdistribusi tidak normal dan dilanjutkan dengan uji kruskal wallis.

b. Uji *one way anova*

Uji *one way anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan ekstrak daun pandan wangi pada konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80% dan 90% apabila data berdistribusi normal.

c. LSD *(Least Significant Deference)*

Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.