

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis dari penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan metode dilusi.

#### B. Identifikasi Variabel

##### 1. Variabel Pengaruh

Konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) 10%, 20% dan 40%.

##### 2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada plat resin akrilik aktivasi panas.

##### 3. Variabel Terkendali

- a. Resin akrilik aktivasi panas.
- b. Diameter cakram resin akrilik 10 mm dengan ketebalan 2 mm.
- c. Perbandingan monomer dan polimer 1 : 3.
- d. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam suspensi *Lactobacillus acidophilus* selama 24 jam pada suhu 37° C.
- e. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) 8 jam pada suhu kamar.
- f. Lama perendaman cawan petri dalam inkubator 24 jam pada suhu 37° C.

- g. Volume *Lactobacillus acidophilus* 10 ml dengan konsentrasi sesuai dengan standar Brown III ( $10^8$ CFU/ml).

#### 4. Variabel Tak Terkendali

- a. Penyebaran suspensi bakteri.
- b. Kontaminasi bakteri dan jamur lain.
- c. Jumlah *Lactobacillus acidophilus* pada plat resin akrilik.
- d. Usia tanaman.
- e. *Working time* resin akrilik.
- f. Lama penyimpanan sampel.
- g. Kepadatan plat resin akrilik aktivasi panas.
- h. Keporusan plat resin akrilik aktivasi panas.
- i. Kekerasan plat resin akrilik aktivasi panas.

#### C. Definisi Operasional

1. Plat resin akrilik aktivasi panas adalah plat dalam bentuk cakram yang dibuat dari resin akrilik polimerisasi panas dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.
2. Saliva buatan adalah larutan yang terbuat dari *Dipotassium hydrogen phospat* ( $K_2HPO_4$ ), *Calcium phospat* ( $Ca_3(PO_4)_2$ ), *Potassium tiosinat* ( $KCN_5$ ), *Sodium bikarbonat* ( $NaHCO_3$ ), *Sodium chloride* ( $NaCl$ ), *Potassium chloride* ( $KCl$ ), *Urea* ( $(NH_2)_2CO$ ). Merupakan media yang membantu perlekatan *Lactobacillus acidophilus* pada plat resin akrilik.

3. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri gram positif berbentuk basil atau kokobasil dengan pola berpasangan dan rantai.
4. Suspensi *Lactobacillus acidophilus*  $10^8$ CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Lactobacillus acidophilus* yang disuburkan dan diencerkan dengan aquades steril hingga mencapai kekeruhan sesuai standar Brown III.
5. Daun kelor (*Moringa oleifera*) adalah tumbuhan dari suku *moringaceae*, diperoleh dari Desa Kaliurip, Kecamatan Madukara, Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah.
6. Ekstrak konsentrasi 10% didapatkan dengan cara 1 ml ekstrak kental daun kelor konsentrasi 100% + 9 ml aquades steril. Ekstrak konsentrasi 20% didapatkan dengan cara 2 ml ekstrak kental daun kelor konsentrasi 100% + 8 ml aquades steril. Ekstrak konsentrasi 40% didapatkan dengan cara 4 ml ekstrak kental daun kelor konsentrasi 100% + 6 ml aquades steril.
7. Maserasi adalah cara penyaringan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif mudah larut dalam cairan penyari, dengan tujuan untuk mengendapkan zat-zat yang tidak diperlukan dan melarutkan zat-zat yang diperlukan dengan perbandingan dan konsentrasi tertentu.

#### D. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2014 di Laboratorium Gigi RSGM Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Kota Yogyakarta, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### E. Penentuan Jumlah Sampel

Jumlah sampel pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus dari Lemeshow dkk., (1997) :

$$n = \frac{Z^2 1 - \alpha / 2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan rumus :

- n = Jumlah sampel tiap kelompok
- Z = Harga standar normal pada  $\alpha$  tertentu yang di gunakan dalam penelitian
- $\sigma$  = Variasi populasi yang dapat di estimasi dari simpangan baku penelitian sejenis sebelumnya
- d = Presesi (normal 0,01 – 0,25)

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan besar sampel penelitian ini adalah :

$$\begin{aligned} Z &= 1,96 (\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{1 - 4/2} = Z_{0,975} = 1,96) \\ \sigma &= 0,135 \text{ (Sano dkk., 1994)} \\ d &= 0,155 \text{ (Darmawangsa, 2005).} \end{aligned}$$

Didapat sampel penelitian  $n = 5,294000756 \rightarrow$  dibulatkan menjadi 5.

## **F. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

- a. Kuvet
- b. *Spatula* dan *rubber bowl*
- c. *Stellon pot*
- d. Crownmess
- e. Press
- f. Finishing dan polishing buar
- g. Tabung reaksi
- h. Tabung *elemeyer*
- i. Cawan petri
- j. Corong *Buchner*
- k. *Ose* steril
- l. Lampu spiritus
- m. *Vacum rotary evaporator*
- n. Inkubator.
- o. *Autoclave*
- p. Pinset steril

- q. Lemari pengering 45°C
- r. Mesin penyerbuk
- s. *Koloni counter*
- t. Masker
- u. Handscoon
- v. Loop

## **2. Bahan Penelitian**

- a. Larutan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%.
- b. Aquades steril
- c. Sediaan bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>8</sup> CFU/ml.
- d. Media *Mueller Salt Agar* (MSA)
- e. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
- f. Etanol 70%
- g. Model malam merah dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm
- h. Gips
- i. *Cold mould seal* (CMS)
- j. Resin akrilik polimerisasi panas dengan merk QC-20
- k. Vaseline
- l. Cellophan
- m. Alkohol 70%
- n. Saliva buatan

## **G. Jalannya Penelitian**

### **1. Persiapan Cakram Resin Akrilik**

Resin akrilik yang akan digunakan adalah jenis resin akrilik aktivasi panas diproses dengan perebusan, perbandingan polimer dengan monomer tiga berbanding satu. Cakram resin akrilik dibuat dengan cara model malam dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm ditanam dalam kuvet dengan gips plaster. Setelah itu gips diolesi vaselin lalu dibuat kontra model. Model malam dihilangkan dengan air mendidih kemudian kuvet dengan gips dan rongga cetaknya dibiarkan dingin. Adonan resin akrilik yang dibuat dalam *stellon pot* dimasukkan pada *fase dough* ke dalam rongga cetakan, kuvet ditutup kembali lalu diberi tekanan dengan press sampai terjadi kontak metal dengan metal. Kuvet beserta press direbus selama satu jam, didinginkan, kemudian dibuka dan resin akrilik dibersihkan dari sisa-sisa gips. Cakram resin akrilik difinishing dan dipolishing sampai halus. Semua cakram resin akrilik disterilkan dengan alkohol 70%.

### **2. Persiapan Larutan Ekstrak Daun Kelor**

Pembuatan ekstrak daun kelor dilakukan dengan menggunakan teknik maserasi. Daun kelor dikeringkan di dalam lemari pengering suhu 45°C selama 48 jam. Daun kelor diserbuk dengan mesin penyerbuk dengan diameter lubang saring 1 mm. Serbuk daun kelor diekstraksi dengan etanol 70% dan dimaserasi selama 24 jam. Setelah dimaserasi dilakukan filtrasi dengan

menggunakan corong *Buchner* untuk mendapatkan filtratnya. Selanjutnya filtrat dievaporasi untuk menghilangkan air dan etanol dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C. Hasil setelah dievaporasi adalah ekstrak kental daun kelor.

### 3. Persiapan *Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari hasil biakan di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Kota Yogyakarta. Koloni *Lactobacillus acidophilus* diambil menggunakan ose steril dan disuburkan dengan dilarutkan dalam 0,5 ml media BHI cair, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sehingga diperoleh suspensi *Lactobacillus acidophilus*. Lalu suspensi *Lactobacillus acidophilus* diencerkan dengan menambah akuades steril sehingga mencapai kekeruhan tertentu sesuai dengan standar Brown III yaitu  $10^8$  CFU/ml.

### 4. Perlakuan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan metode dilusi atau pengenceran seri yaitu dengan cara cakram resin akrilik diameter 10 mm dan tebal 2 mm sebanyak 20 buah (nomor 1 – 20) disterilkan dengan alkohol 70% selama 5 menit. Lalu cakram resin akrilik diambil dengan pinset steril dan direndam dalam saliva sebagai media perlekatan bakteri. Setelah itu cakram resin akrilik diambil dan direndam 10 ml suspensi *Lactobacillus acidophilus* selama 24 jam pada suhu 37°C dalam tabung reaksi. 20 buah cakram resin

akrilik dibagi menjadi 4 kelompok, yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 cakram resin akrilik. Kelompok I terdiri dari cakram resin akrilik nomor 1 – 5 yang direndam dalam 10 ml ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 10% dan ditempatkan dalam tabung nomor 1 – 5. Kelompok II terdiri dari cakram resin akrilik nomor 6 – 10 yang direndam dalam 10 ml ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 20% dan ditempatkan dalam tabung nomor 6 – 10. Kelompok III terdiri dari cakram resin akrilik nomor 11 – 15 yang direndam dalam 10 ml ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 40% dan ditempatkan dalam tabung nomor 11 – 15. Kelompok IV terdiri dari cakram resin akrilik nomor 16 – 20 yang direndam dalam aquades steril dan ditempatkan dalam tabung nomor 16 – 20.

Cakram resin akrilik nomor 1 – 20, masing-masing dikocok dengan vortex mixer selama 1 menit dan masing-masing tabung reaksi dilakukan pengenceran seri sampai  $10^3$ , dengan cara pengenceran P1 ( $10^1$ ) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan dari tabung reaksi nomor 1 ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Pengenceran P2 ( $10^2$ ) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P1 ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Pengenceran P3 ( $10^3$ ) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P2 ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Lalu ambil 0,01 ml larutan tes dari pengenceran P3, kemudian ditetaskan dan ratakan pada cawan petri agar MSA

dan dieramkan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Hal yang sama dilakukan juga pada tabung reaksi nomor 2 – 20. Setelah itu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan kaca pembesar dan alat hitung berupa *koloni counter*. Perhitungan angka bakteri masing-masing konsentrasi ekstrak daun kelor dan larutan kontrol digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Angka bakteri} = \frac{\text{jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume larutan yang dihitung}}$$

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak pada masing-masing konsentrasi dilakukan perhitungan Kadar Hambat Minimal (KHM) dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{KHM} = 100\% - \frac{\text{ABT}}{\text{ABK}} \times 100\%$$

Keterangan :

KHM = Kadar hambat minimal

ABT = Angka Bakteri dalam CFU/ml pada konsentrasi tertentu

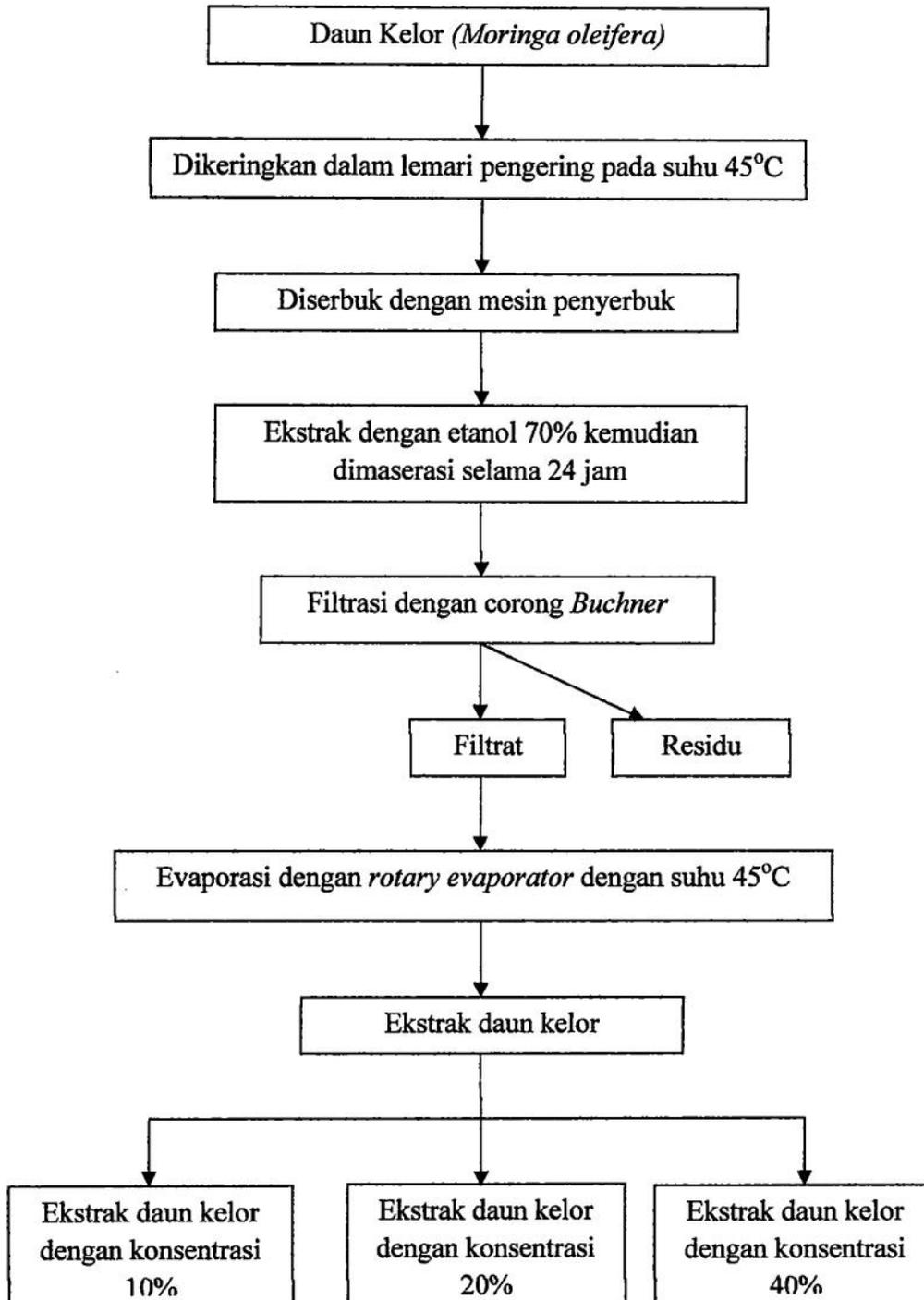
ABK = Angka bakteri dalam CFU/ml pada kontrol

## H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada berbagai konsentrasi dan kontrol terhadap pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dilakukan uji statistik *Kruskal-Wallis*. Selanjutnya untuk mengetahui rerata perbedaan dari masing-masing kelompok dilakukan uji Mann-Whitney dan Independent Sample t-Test.

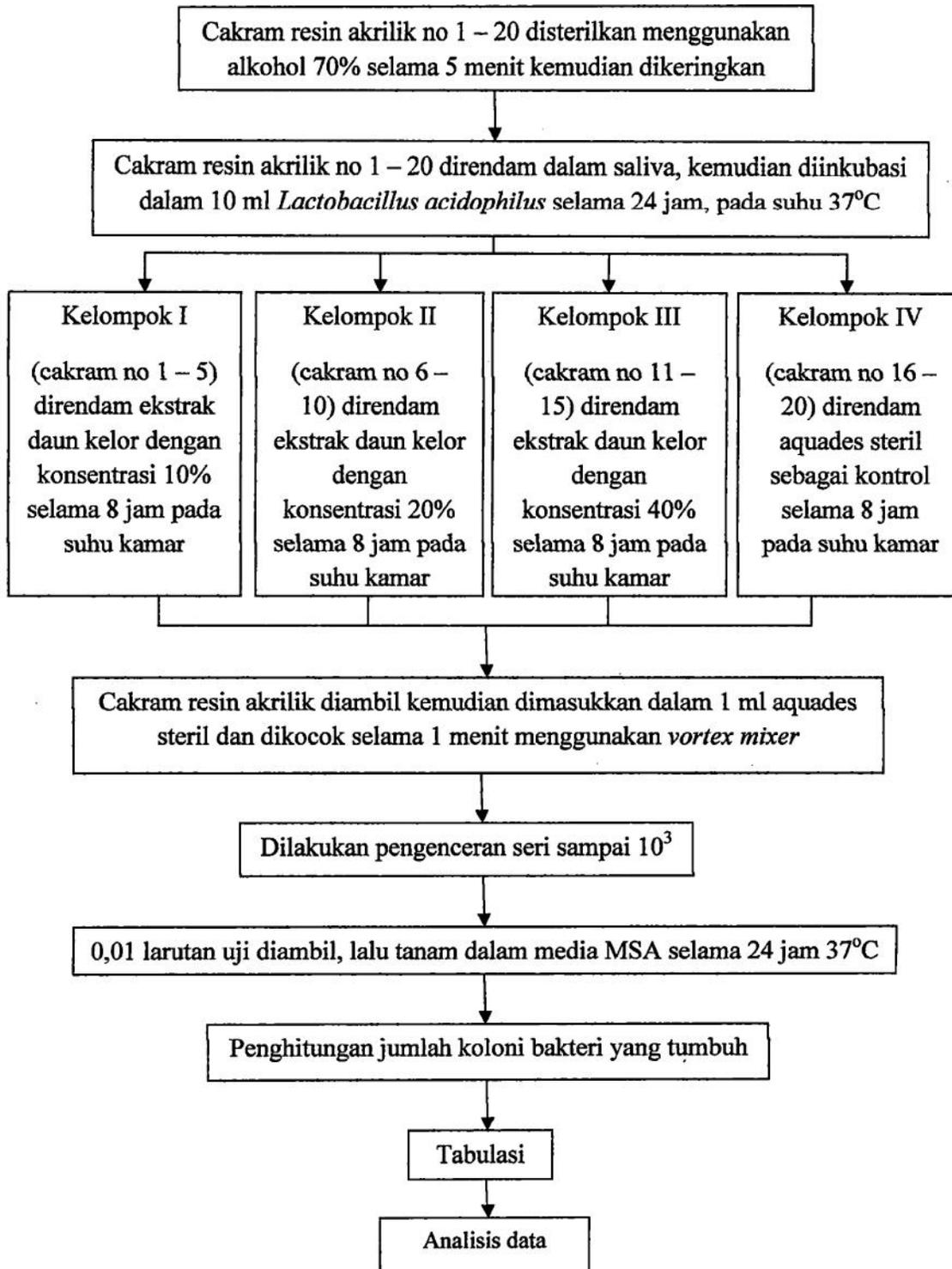
## I. Alur Penelitian

### 1. Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kelor



Gambar 4. Alur Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor

## 2. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5. Alur Jalannya Penelitian