

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris, dengan metode dilusi.

#### **B. Identifikasi Variabel**

##### 1. Variabel Pengaruh

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

##### 2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada 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 *Streptococcus pyogenes* selama 24 jam pada suhu 37°C.
- e. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak daun kelor 8 jam pada suhu kamar.
- f. Lama perendaman cawan petri dalam inkubator 24 jam pada suhu 37°C.
- g. Volume *Streptococcus pyogenes* 10ml 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 *Streptococcus pyogenes* pada resin akrilik
- d. Usia tanaman
- e. *Working time* resin akrilik
- f. Lama penyimpanan sampel.

#### C. Definisi Operasional

1. Plat resin akrilik dalam bentuk cakram yang dibuat dari resin akrilik polimerisasi panas dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.
2. Saliva buatan merupakan media
3. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri penyebab infeksi lokal atau sistemik.
4. Suspensi *Streptococcus pyogenes*  $10^8$ CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Streptococcus pyogenes* yang disuburkan dan diencerkan dengan aquades steril hingga mencapai kekeruhan sesuai standar Brown III.
5. Daun kelor (*Moringa oleifera L.*) adalah tumbuhan dari suku *moringaceae*, diperoleh dari Desa Kaliurip, Kecamatan Madukara, Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah.
6. 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 untuk

mengendapkan zat – zat tidak diperlukan dan melarutkan zat – zat yang diperlukan dengan perbandingan dan konsentrasi tertentu.

7. Konsentrasi 10% didapatkan dengan cara 1 ml ekstrak 100% daun kelor + 9 ml auades steril. Konsentrasi 20% didapat dengan cara 2 ml ekstrak 100% daun kelor + 8 ml aquades steril. Konsentrasi 40% didapatkan dengan cara 4 ml ekstrak 100% daun kelor + 6 ml aquades steril.

#### **D. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan oktober 2014 di dental lab RSGM . Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) kota Yogyakarta.

#### **E. Penentuan Jumlah Sampel**

Penentuan sampel pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus dr.Lameshow dkk (1997).

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

Keterangan rumus :  $1-\alpha$

$n$  = 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 :

$Z = 1,96$  ( $\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{1 - 4/2} = Z_{0,975} = 1,96$ )

$\sigma = 0,135$  (Sano dkk., 1994)

$d = 0,155$  (Darmawangsa, 2005)

Sehingga  $n = 5,294000756 \rightarrow$  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. Cawan petri.
- i. Corong *Buchner*.
- j. Ose steril.
- k. Lampu spiritus.
- l. *Vacum rotary evaporator*.
- m. Inkubator .
- n. *Autoclave*.
- o. Pinset steril .
- p. Lemari pengering.
- q. Mesin penyerbuk.
- r. Kaca pembesar.
- s. Tabung elenmeyer
- t. Masker.

- u. Handscoon.
- v. Colony counter.

## 2. Bahan Penelitian

- a. Larutan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%.
- b. Aquades steril.
- c. Sediaan bakteri *Streptococcus pyogenes*  $10^8$  CFU/ml.
- d. Media *Muller Salt Agar* (MSA).
- e. Media *Brain Heart Infusion* (BHI).
- f. Metanol 60%.
- g. Model malam merah dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm,.
- h. Gips .
- i. *Cold mould seal* (CMS) .
- j. Resin akrilik aktivasi panas merk QC-2.
- k. Vaseline.
- l. *Cellophan*.
- m. Alkohol 70%.
- n. Saliva buatan.

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Tahap persiapan Penelitian

- a. Persiapan cakram resin akrilik

Resin akrilik yang akan digunakan adalah jenis resin akrilik aktivasi panas dengan proses perebusan, perbandingan polimer dengan

monomer tiga berbanding satu. Cakram resin akrilik dibuat dengan model malam dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2mm ditanam dalam kuvet dengan gips plester. Setelah gips diolesi vaselin lalu dibuat kontra model. Model malam dihilangkan dengan air mendidih kemudian kuvet dengan gips dan rongga cetakannya dibiarkan mendingin. Adonan resin akrilik yang dibuat dalam stellan pot dimasukkan pada fase gough ke dalam rongga cetakan, kuvet ditutup kembali lalu diberi tekanan dengan press sampai terjadi kontak mental 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 lalu dipoles sampai halus. Semua cakram resin akrilik disterilkan dengan alkohol 70%.

b. Persiapan larutan ekstrak daun kelor

Ekstrak daun kelor dilakukan dengan menggunakan teknik maserasi. Daun kelor dikeringkan di dalam lemari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam. Daun kelor diserbuk dengan mesin penyerbuk dengan diameter lubang saring 1 mm. Serbuk daun kelor diekstraksi dengan metanol 60% dan dimaserasi selama 24 jam. Setelah dimaserasi dilakukan filtrasi dengan menggunakan corong Buchner untuk mendapatkan filtratnya. Selanjutnya filtrat dievaporasi untuk menghilangkan air dan metanol dengan menggunakan *rotary*

*evaporator* dengan suhu 45°C. Hasil setelah dievaporasi adalah ekstrak kental daun kelor.

c. Persiapan *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* diperoleh dari hasil biakan di Badan Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Koloni *Streptococcus pyogenes* 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 *Streptococcus pyogenes*. Suspensi *Streptococcus pyogenes* diencerkan dengan menambah akuades steril sehingga mencapai kekeruhan tertentu sesuai dengan standar Brown III yaitu  $10^8$  CFU/ml.

2. 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. Cakram resin akrilik diambil dengan pinset steril dan direndam dalam saliva sebagai media perlekatan bakteri selama 24 jam. Cakram resin akrilik diambil dan direndam 10 ml suspensi *Streptococcus pyogenes* selama 24 jam pada suhu 37°C dalam tabung reaksi. 20 buah cakram resin akrilik dibagi menjadi 4 kelompok, 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 11 – 15. 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 – 10, masing – masing dikocok dengan vortex mixer selama 1 menit dan masing – masing tabung reaksi dilakukan pengenceran seri sampai  $10^3$ , pertama 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, kemudian 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, selanjutnya diambil 0,01 ml larutan tes dari pengenceran P3, kemudian diteteskan dan ratakan pada cawan petri agar MSA dan dieramkan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Hal yang sama dilakukan juga pada tabung reaksi nomor 2 - 20. Setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan kaca pembesar dan alat hitung berupa counter.

Untuk mengetahui daya antibakteri pada masing- masing konsentrasi dilakukan perhitungan Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan rumus sebagai berikut :

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

keterangan:

KHM = Kadar Hambat Minimum

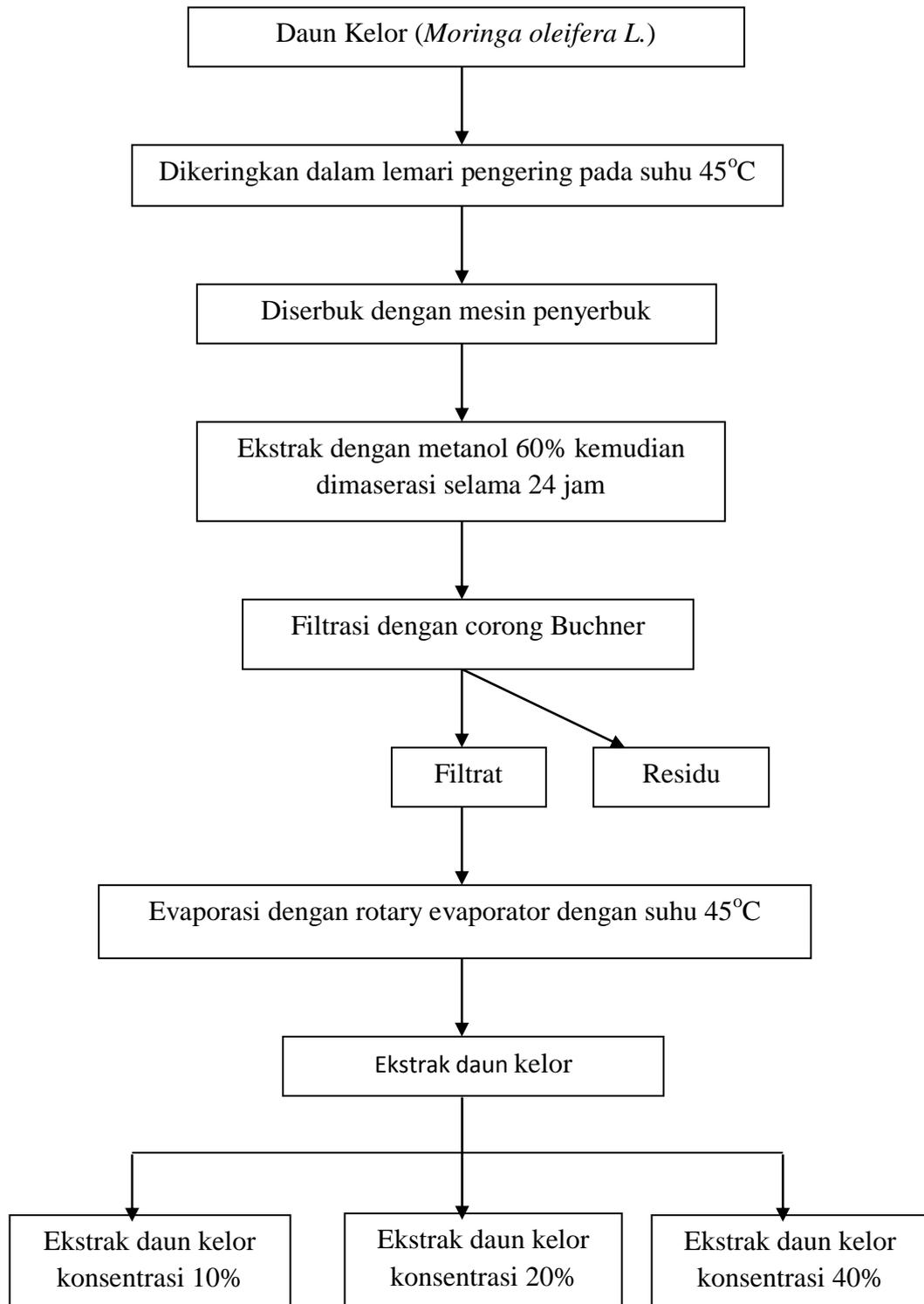
ABT = Angka Bakteri dalam CFU/ml pada konsentrasi tertentu

ABK = Angka Bakteri dalam CFU/ml pada kontrol

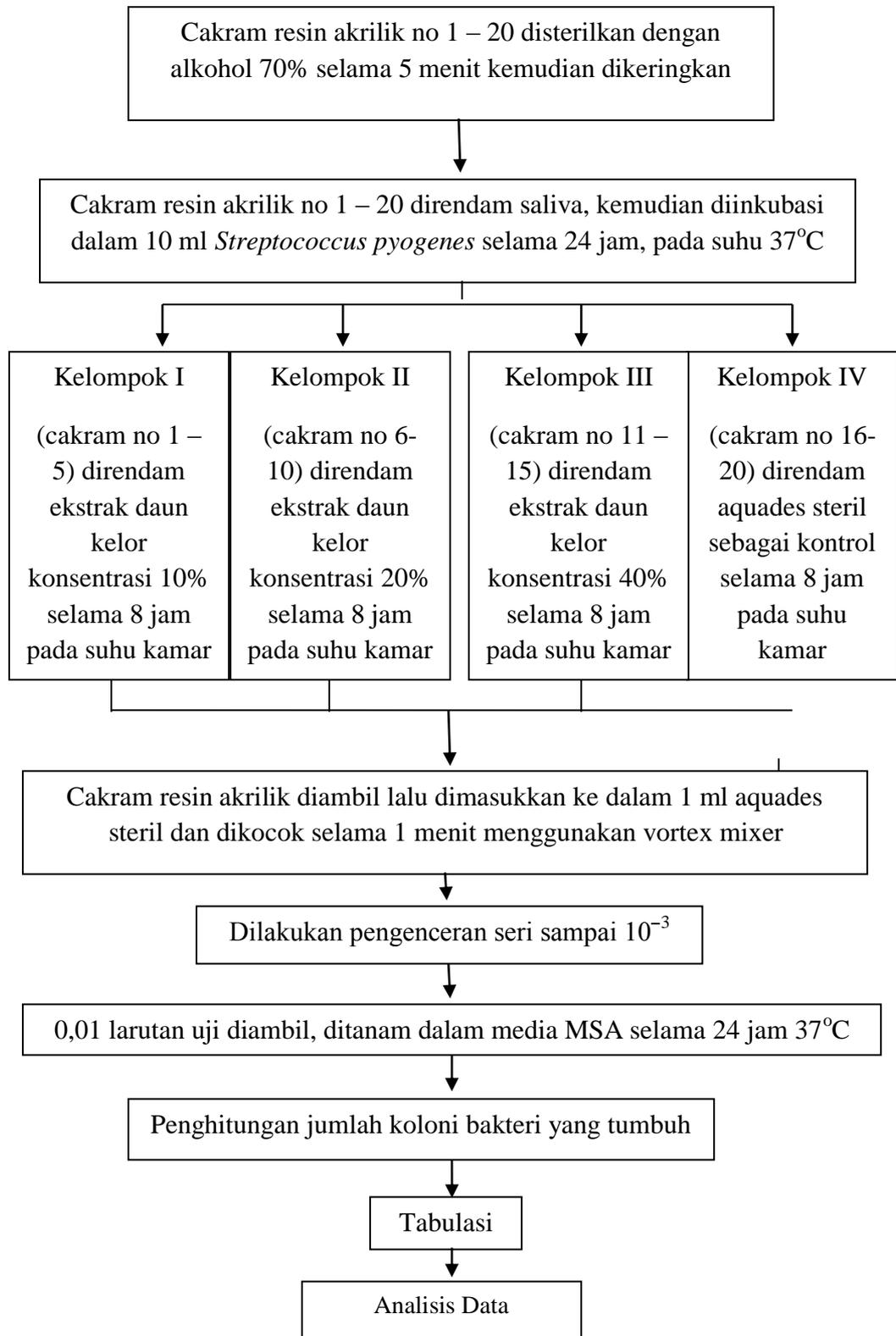
#### H. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh dari larutan ekstrak daun kelor pada berbagai konsentrasi dan kontrol terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* menggunakan analisis variasi (ANOVA) satu jalur. Setelah itu dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Diference*) dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 0,05$ ) untuk mengetahui perbedaan pengaruh khasiat antara larutan ekstrak daun kelor pada berbagai konsentrasi dan kontrol.

## I. Alur Penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*)



Gambar 5. Skema jalannya penelitian