

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan metode dilusi.

B. Identifikasi Variabel

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) konsentrasi 10 %, 20% dan 40%.

2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* 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 *Staphylococcus aureus* 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 *Staphylococcus aureus* 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 *Staphylococcus aureus* pada resin akrilik
- d. *Working time* resin akrilik
- e. Lama penyimpanan sampel
- f. Kepadatan plat resin akrilik
- g. Keporusan plat resin akrilik
- h. Kekasaran plat resin akrilik
- i. Usia tanaman

C. Definisi Operasional

1. Plat resin akrilik dalam bentuk cakram yang dibuat dari resin akrilik aktivasi panas dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.
2. Saliva buatan merupakan media yang membantu perlekatan *Staphylococcus aureus* pada resin akrilik. Saliva buatan merupakan larutan yang terbuat dari *Dipotassium Hydrogen Phospat* (K_2HPO_4), *Calcium Phospat* ($Ca_3(PO_4)_2$), *Potasium Tiosinat* (KCN_5), *Sodium Bikarbonat* ($NaHCO_3$), *Sodium Cloride* ($NaCl$), *Potasium Chloride* (KCL), *Urea* ($(NH_2)_2CO$)
3. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif berbentuk bulat dan tersusun bergerombol menyerupai buah anggur.

4. Suspensi *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Staphylococcus* 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, kec. Madukara, kab. Banjarnegara, Jawa Tengah.
6. Konsentrasi 10% didapatkan dengan cara 1 ml ekstrak 100% daun kelor+ 9 ml aquades steril. Konsentrasi 20% didapatkan dengan cara 2 ml ekstrak 100% + 8 ml aquades steril. Konsentrasi 40% didapatkan dengan cara 4 ml ekstrak 100%+ 6 ml aquades steril.
7. Maserasi adalah cara penyaringan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyaring. Maserasi digunakan untuk penyaringan simplisia yang mengandung zat aktif mudah larut dalam cairan penyaring untuk mengendapkan zat-zat 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) Yogyakarta, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah 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 :

n = Jumlah sampel tiap kelompok

Z = Harga standar normal pada α tertentu yang di gunakan dalam penelitian

σ = Variasi populasi yang dapat di estimasi dari simpangan baku penelitian sejenis sebelumnya

d = Presepsi (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)

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 bur
- g. Tabung reaksi

- h. Cawan petri
- i. Corong *Buchner*
- j. Ose steril
- k. Lampu spritus
- l. Vacum rotary evaporator
- m. Inkubator
- n. Autoclave
- o. Pinset steril
- p. Lemari pengering 45°C
- q. Mesin penyerbuk
- r. Tabung erlermeyer
- s. Masker
- t. Handscoon
- u. Colony Counter
- v. Kaca Pembesar

2. Bahan Penelitian

- a. Larutan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%
- b. Aquades steril
- c. Sediaan bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁸ CFU/ml.
- d. Media Muller 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 aktivasi panas dengan merk QC-20
- k. Vaseline
- l. Cellophan
- m. Alkohol 70%
- n. Saliva buatan

G. Jalannya Penelitian

1. Tahapan Persiapan Penelitian

a. Persiapan cakram resin akrilik

Resin akrilik yang digunakan adalah jenis resin akrilik polimerisasi panas dengan proses 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 plester. Setelah gips keras, 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 *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 1 jam, didinginkan, kemudian dibuka dan resin

akrilik dibersihkan dari 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 (*Moringa oleifera L.*) dilakukan dengan teknik maserasi. Daun kelor (*Moringa oleifera L.*) dikeringkan dalam lemari pengering suhu 45⁰ C selama 48 jam. Daun kelor (*Moringa oleifera L.*) diserbuk dengan mesin penyerbuk dengan diameter lubang saringan 1 mm. Serbuk daun kelor (*Moringa oleifera L.*) diekstrak 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 70⁰C. Hasil setelah evaporasi adalah ekstrak kental daun kelor (*Moringa oleifera L.*).

c. Persiapan *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus diperoleh dari hasil biakan di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta. Koloni *Staphylococcus aureus* diambil menggunakan ose steril dan disuburkan dengan dilarutkan dalam 0,5 ml media BHI cair, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37⁰ C sehingga diperoleh suspensi *Staphylococcus aureus*. Suspensi *Staphylococcus aureus* 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 cair 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. Cakram resin akrilik diambil dan direndam 10 ml suspensi *Staphylococcus aureus* selama 24 jam pada suhu 37°C dalam tabung reaksi. 20 buah cakram resin akrilik dibagi menjadi IV kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 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 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 5-10. Kelompok III terdiri dari cakram resin akrilik nomor 10-15 yang direndam dalam 10 ml ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 40% dan ditempatkan dalam tabung 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 miker* selama 1 menit dan masing-masing tabung reaksi dilakukan pengenceran seri dengan sampai 10^3 . 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. Diambil 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 37^0 C. Hal yang sama dilakukan juga pada tabung reaksi nomor 2-20. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0 C, kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan kaca pembesardan alat penghitung berupa *counter*. Perhitungan angka bakteri masing-masing konsentrasi ekstrak daun kelor dan larutan kontrol digunakan rumus sebagai berikut:

Jumlah koloni x faktor pengenceran

Angka bakteri = _____

Volume larutan yang dihitung

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

ABT

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

ABK

Keterangan

KHM = Kadar hambat minimal

ABT = Angka Bakteri dalam CFU/ml pada konsentrasi tertentu

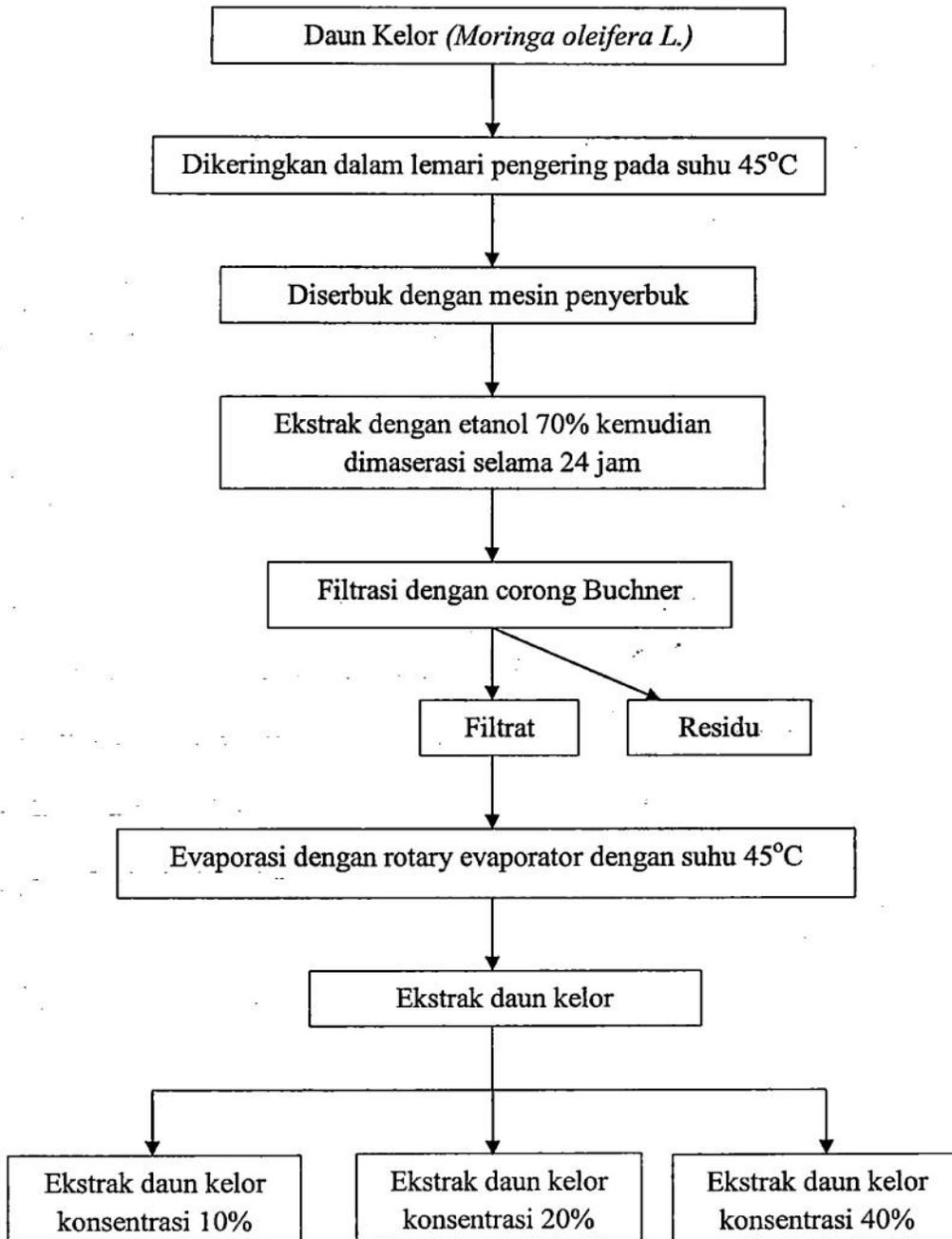
ABK = Angka bakteri dalam CFU/ml pada kontrol.

H. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh dari larutan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) pada berbagai konsentrasi dan kontrol terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* menggunakan analisis Kruskal Wallis. Setelah itu dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney dan Independent Sample Test untuk mengetahui perbedaan pengaruh khasiat antara larutan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) pada berbagai konsentrasi dan kontrol.

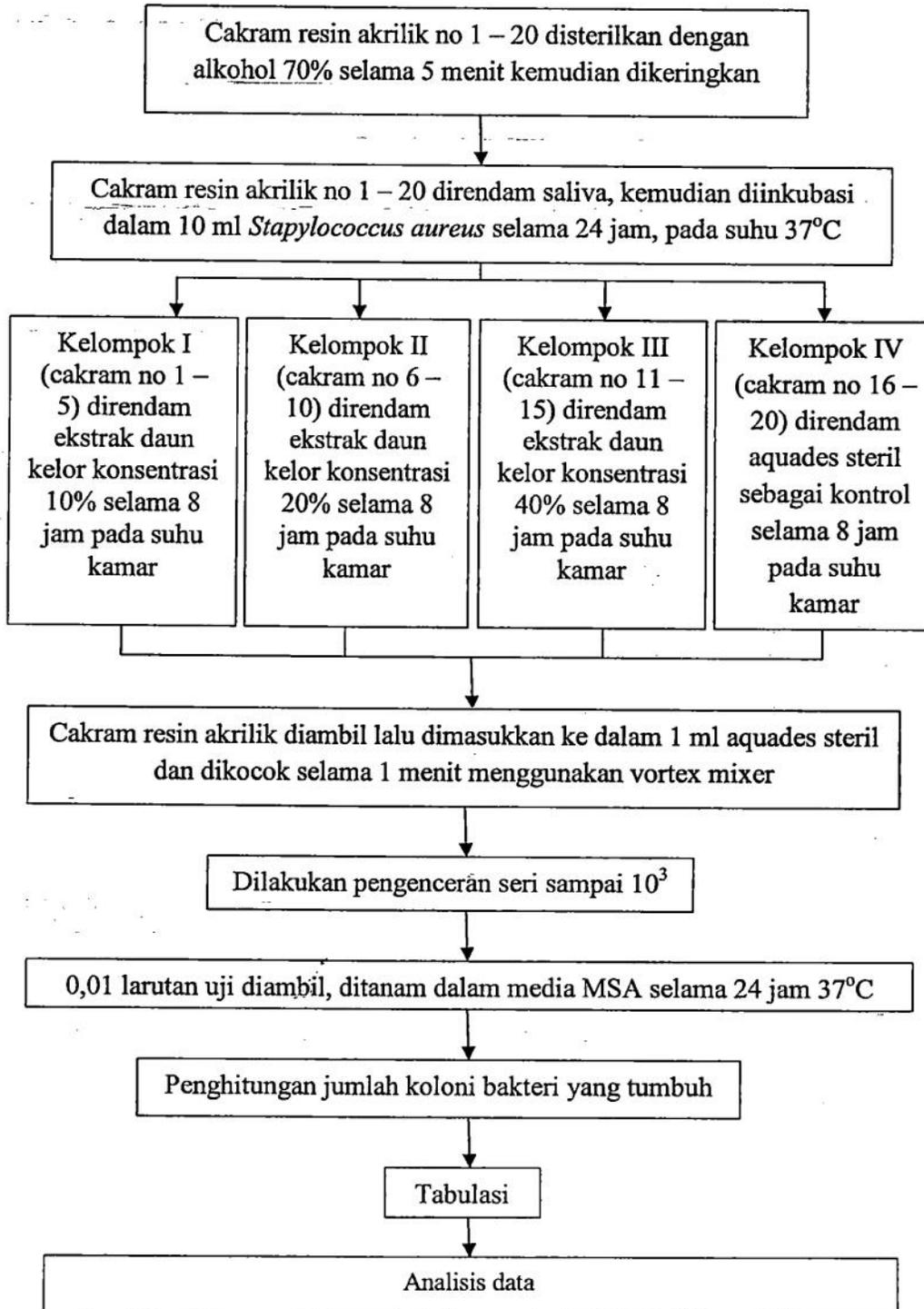
I. Alur Penelitian

SKEMA PEMBUATAN EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera L.*)



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

SKEMA JALANNYA PENELITIAN



Gambar 5 skema jalannya penelitian