

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan metode dilusi.

B. Identifikasi Variabel

1. Variabel Pengaruh

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

2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* 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 mutans* 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 mutans* 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 *Streptococcus mutans* pada resin akrilik
- d. Usia tanaman
- e. *Working time* resin akrilik
- f. Lama penyimpanan sample

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 dengan pH 6,7 memiliki komposisi 0,20 g/l Dipotasium hydrogen fospat (K_2HPO_4), 0,30 g/l Calcium fospat ($Ca_3(PO_4)_2$), 0,33 Potasium tiosianat (KCN_3), 1,50 g/l Sodium Bikarbonat ($NaHCO_3$), 0,70 g/l Sodium Chloride ($NaCl$), 1,20 g/l Potasium Chloride (KCl) dan 0,13 g/l Urea ($(NH_2)_2CO$) yang merupakan media untuk membantu perlekatan *Streptococcus mutans* pada resin akrilik.
3. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif berbentuk bulat atau bulat telur yang tersusun dalam bentuk rantai.
4. Suspensi *Streptococcus mutans* 10^8 CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Streptococcus mutans* 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* yang diperoleh dari desa Kaliurip, Kecamatan Madukara, Kabupaten 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% daun kelor + 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 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.

D. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Oktober 2014 di laboratorium gigi RSGM UMY Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) kota Yogyakarta, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

E. Penentuan Jumlah Sampel

Rumus dari Lameshow dkk.(1997)

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

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok

Z = harga standar normal pada σ tertentu yang digunakan dalam penelitian

σ = variasi populasi yang dapat diestimasi dari simpangan baku penelitian sejenis sebelumnya

d = presisi (normal 0,01 – 0,25)

Berdasarkan rumus tersebut maka perhitungan besar sampel penelitian

ini adalah

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

$$\sigma = 0,135 \quad (\text{Sano dkk., 1994})$$

$$d = 0,155 \quad (\text{Darmawangsa, 2005})$$

Sehingga sampel penelitian yang dibutuhkan minimal 5 sampel

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. 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
 - r. Mesin penyerbuk
 - s. Masker
 - t. Handscoon
 - u. Loop
 - 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 mutans* 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-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 dengan proses perebusan, perbandingan polimer dengan monomer tiga berbanding satu. Cakram resin akrilik dibuat dengan cara: 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 *stellon pot* dimasukkan pada fase *dough* 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%.

2. Persiapan larutan ekstrak daun kelor

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

3. Persiapan *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans diperoleh dari hasil biakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Koloni *Streptococcus mutans* 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 mutans*. Suspensi *Streptococcus mutans* 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. Cakram resin akrilik diambil dengan pinset steril dan direndam dalam saliva sebagai media perlekatan bakteri. Cakram resin akrilik diambil dan direndam 10 ml suspensi *Streptococcus mutans* 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 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. 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°C. Hal yang sama dilakukan juga pada tabung reaksi nomor 2-20. Setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan kaca pembesar dan alat hitung berupa 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 daya antibakteri 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 control

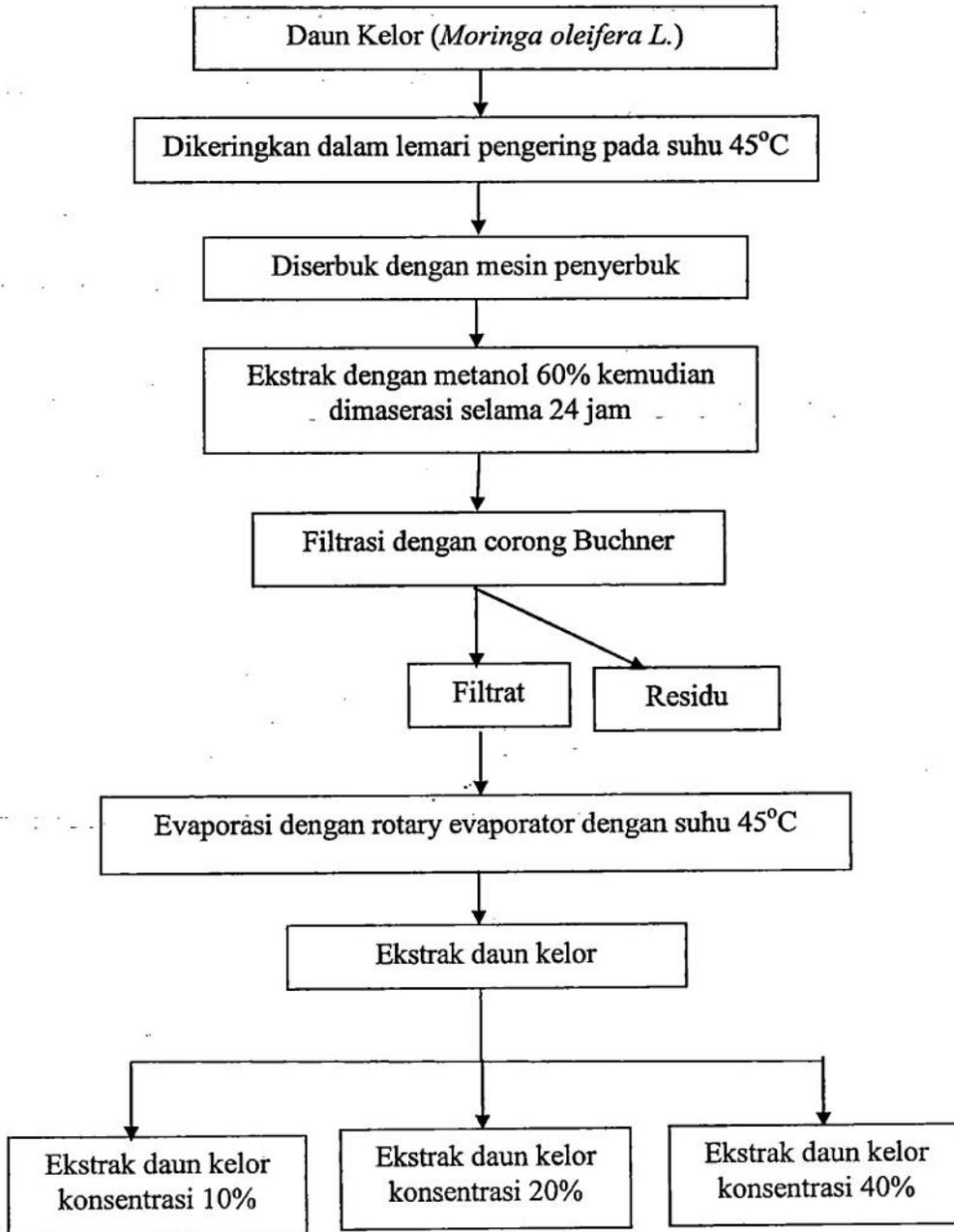
H. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh dari larutan ekstrak daun kelor pada berbagai konsentrasi dan kontrol terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* menggunakan analisis Kruskal-Wallis. Setelah itu dilanjutkan dengan Uji Mann – Whitney dan Independent Sample t – Test dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui perbedaan pengaruh

kehasiatan antara larutan ekstrak daun kelor pada berbagai konsentrasi dan kontrol.

I. – Alur Penelitian

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



SKEMA JALANNYA PENELITIAN

