

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian *quasi experiment*. Rancangan penelitian ini adalah *Post Test Only Control Group* yaitu pengamatan pada kelompok eksperimen dan kontrol dilakukan setelah perlakuan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Sriwijaya untuk pembuatan ekstrak *G. pseudochina* dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang untuk kultur dan penghitungan bakteri *S.aureus*. Penelitian telah dilakukan dari tanggal 4 Maret 2020 sampai 26 Maret 2020.

3.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* yang telah ditumbuhkan pada media *Plate Count Agar* selama 24 jam suhu 37⁰C.

3.3.1 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus:⁴⁰

$$n = 2 \left[\frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})S}{X_1 - X_2} \right]^2$$

Keterangan:

n = jumlah sampel

$Z_{1-\alpha/2}$ = nilai Z untuk tingkat kepercayaan 99% (2,58)

$Z_{1-\beta}$ = nilai $Z_{1-\beta}$ untuk *power test* 95% (1,64)

$X_1 - X_2$ = beda rerata minimal penelitian sebelumnya yang dianggap signifikan.¹¹

S = standar deviasi variabel yang diteliti

Standar deviasi penelitian diperoleh dengan rumus:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

Keterangan:

$n_1 = n_2$ = jumlah sampel pada penelitian sebelumnya (10)¹¹

S_1 = simpangan baku penelitian sebelumnya variabel 1 (6,129)¹¹

S_2 = simpangan baku penelitian sebelumnya variabel 2 (5,216)¹¹

Sehingga,

$$S^2 = \frac{(10 - 1)6,129^2 + (10 - 1)5,216^2}{(10 - 1) + (10 - 1)}$$

$$S^2 = \frac{(9)37,564641 + (9)27,206656}{(9) + (9)}$$

$$S^2 = \frac{338,081769 + 244,859904}{18}$$

$$S^2 = \frac{582,941673}{18}$$

$$S^2 = 32,38566485$$

$$S = 5,69$$

Didapatkan nilai n :

$$n = 2 \left[\frac{(2,58 + 1,64)5,69}{52,7 - 37,1} \right]^2$$

$$n = 2 \left[\frac{(4,22)5,69}{15,6} \right]^2$$

$$n = 2 \left[\frac{24,0118}{15,6} \right]^2$$

$$n = 2 [1,539217949]^2$$

$$n = 2 [2,369191894]$$

$$n = 4,738 \approx 5$$

Penentuan konsentrasi ekstrak pada penelitian ini didasarkan pada 2 penelitian referensi. Penelitian Bustanussalam dkk. (2015), konsentrasi 25% merupakan konsentrasi efektif dari daun sirih dalam mengurangi pertumbuhan

bakteri *S.aureus*¹⁴. Penelitian oleh Mozartha dkk. (2019), dengan menggunakan ekstrak *G.pseudochina* yang sama dengan penelitian ini sebagai anti jamur *Candida albicans* mendapatkan konsentrasi 20% sebagai konsentrasi paling efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur *C.albicans*.¹³ Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan konsentrasi 25%, 20% dan konsentrasi yang lebih kecil dari keduanya sehingga konsentrasi yang digunakan adalah 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

Sampel dan kontrol dalam penelitian ini dikelompokkan sebagai berikut:

1. Perlakuan 1 : Ekstrak daun *G. pseudochina* 5%.¹³
2. Perlakuan 2 : Ekstrak daun *G. pseudochina* 10%.
3. Perlakuan 3 : Ekstrak daun *G. pseudochina* 15%.
4. Perlakuan 4 : Ekstrak daun *G. pseudochina* 20%.
5. Perlakuan 5 : Ekstrak daun *G. pseudochina* 25%.¹⁴
6. Perlakuan 6 : Kontrol positif dengan sodium hipoklorit 0,5 %.^{8,9}
7. Perlakuan 7 : Kontrol negatif dengan Akuades.

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan jumlah sampel (n) yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 5 sampel tiap kelompok perlakuan. Total keseluruhan sampel sebanyak 35 sampel.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

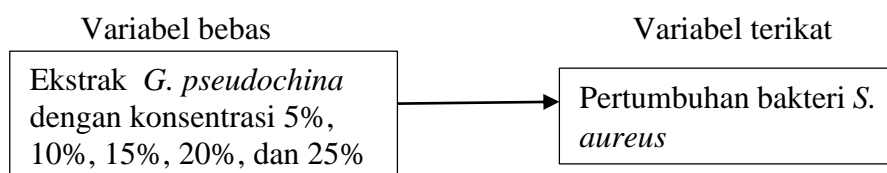
3.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak *G. pseudochina* dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

3.4.3 Variabel Terkendali

1. Media pertumbuhan bakteri
2. Pelarut etanol 96%
3. Waktu inkubasi bakteri *S.aureus* 24 jam
4. Suhu inkubasi bakteri *S.aureus* 37°C

1.5 Kerangka Konsep



3.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak *G.pseudochina* adalah daun *G.pseudochina* segar yang dikeringkan lalu dihaluskan, kemudian diekstraksi melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Selanjutnya diencerkan menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan digunakan sebagai larutan perendaman.
2. Pertumbuhan bakteri *S.aureus* adalah jumlah koloni *S.aureus* yang tumbuh setelah plat direndam pada larutan perendaman, dibilas, dimasukkan pada NaCl 0,9%, diambil 0,1 ml dan dituang dengan media *Plate Count Agar* dan setelah diinkubasi 24 jam. Dihitung dengan alat *Colony counter* dalam satuan *Colony Forming Unit* permililiter (CFU/ml).

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat

1. Penggaris
2. *Cutter*
3. *Lecron*
4. Mangkok karet
5. 2 Spatula (Plastik dan *stainless steel*)
6. Kuvet
7. Cawan akrilik
8. Kuas kecil
9. Plastik selofan
10. Alat pres dari bahan kuningan
11. Panci aluminium
12. *Arkansas stone bur*
13. *Brush polishing*
14. Amplas no.600 dan no.1000
15. Blender listrik untuk menghaluskan *G. pseudochina*
16. Pengayak
17. Timbangan analitik
18. Gelas *beaker*
19. Kertas Saring
20. *Rotary Evaporator*
21. Botol tempat penyimpanan ekstrak *G. pseudochina*
22. Gelas ukur

23. *Micropipette*
24. Pinset
25. Cawan petri
26. Rak dan tabung reaksi ukuran 50 ml
27. Inkubator
28. *Colony counter*
29. Spidol

3.7.2 Bahan

1. Malam merah
2. Gips plaster
3. *Vaseline*
4. *Cold Mould Seal (CMS)*
5. Resin akrilik *heat cured* (Bubuk dan cairan)
6. Daun *G. pseudochina*
7. Etanol 96%
8. Akuades
9. NaOCl 5,25%
10. Saliva buatan yang steril
11. Bakteri *S. aureus*
12. NaCl 0,9 %
13. Media *Brain Heart Infusion*
14. Media *Plate Count Agar (PCA)*
15. PBS (*Phosphate buffer saline*)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Sebelum melakukan penelitian telah dilakukan uji kelayakan etik (*ethical clearance*) oleh Komisi Etik Rumah Sakit Umum Mohammad Hoesin dan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.

3.8.2 Persiapan Pembuatan Lempeng Resin Akrilik

- a. Lempeng dibuat dengan menggunakan model malam merah dan diukur menggunakan penggaris dengan ukuran 10x10x1 mm.⁴⁰ Lempeng malam merah ini digunakan sebagai cetakan sampel lempeng resin akrilik.
- b. Pembuatan *mould space*.²
 1. Adonan gips dibuat dengan perbandingan air dan bubuk sesuai aturan pabrik. Sebanyak 80 ml air dan 160 g gips plaster diaduk dalam mangkok karet dengan menggunakan spatula plastik selama 20-30 detik.
 2. Adonan gips dimasukkan ke dalam kuvet bawah yang telah disiapkan kemudian divibrasi dengan menggunakan vibrator.
 3. Lempeng malam merah diletakkan pada adonan dan didiamkan selama 15 menit atau sampai mengeras.
 4. Permukaan gips pada kuvet bawah diolesi dengan vaselin dan kuvet atas dipasang. Selanjutnya, adonan gips plaster yang telah diaduk dimasukkan pada kuvet atas hingga penuh dan dilakukan sambil vibrasi.
 5. Setelah gips mengeras, kuvet dibuka dan dilakukan pembuangan malam dengan dituangi air panas sampai bersih hingga tidak ada malam yang tersisa.
 6. Setelah bersih, maka didapatkan *mould space* dari cetakan malam merah.

c. Pengisian resin akrilik *heat cured* pada *mould space*.²

1. Bahan resin akrilik *heat cured* diaduk dalam cawan akrilik menggunakan spatula *stainless steel* dengan perbandingan sesuai instruksi pabrik atau 18 gr bubuk dan 6 ml cairan pada suhu kamar lalu ditutup dan ditunggu sampai 4 menit atau mencapai tahap *dough stage*
2. Setelah itu adonan dimasukkan ke dalam cetakan (*mould space*) yang bagian permukaannya telah diolesi *cold mould seal* (CMS) menggunakan kuas dan dipasang plastik selofan lalu tutup kuvet dipasang.
3. Selanjutnya dilakukan pengepresan awal selama 5 detik, kemudian alat pres dilonggarkan dan kuvet dibuka lalu sisa-sisa akrilik yang berlebih dibuang menggunakan lekron. Plastik selofan dipasang kembali dan tutup kuvet kembali dipasangkan, lalu dipres lagi. Kuvet dibuka dan akrilik dirapikan, sisa-sisa akrilik dibuang. Lalu tutup kuvet dipasangkan tanpa plastik selofan dan dipres kembali.

d. Pemasakan.

Proses pemasakan resin akrilik dilakukan dengan cara merendam kuvet ke dalam panci aluminium yang telah berisi air dan dipanaskan hingga mencapai suhu 70°C selama 20 menit kemudian dilanjutkan selama 23 menit pada suhu 100 °C (air mendidih). Selanjutnya kuvet dibiarkan dalam panci hingga mencapai suhu ruang, lalu diangkat.²

e. Penyelesaian

Setelah kuvet mencapai suhu ruang, kuvet dibuka dan lempeng resin akrilik dikeluarkan. *Undercut* pada tepi dihilangkan dengan menggunakan arkansas *stone bur*, kemudian dihaluskan dengan amplas nomor 600 dan 1000. Selanjutnya dilakukan pemolesan dengan menggunakan *brush polishing* pada salah satu permukaan lempeng resin akrilik.²

3.8.3 Persiapan Pembuatan Ekstrak *Gyunara pseudochina*

1. Daun *G. pseudochina* yang didapatkan dari Sekayu, Musi Banyuasin dibersihkan dengan air mengalir, ditiriskan dan dikeringkan dengan diangin-anginkan. Daun yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak sehingga menjadi serbuk simplisia dan diperoleh kurang lebih 500 g bubuk kering daun *G. pseudochina*.⁴²
2. Simplisia direndam pada ruangan gelap dengan pelarut etanol 96% di dalam gelas *beaker* hingga seluruh simplisia *G. pseudochina* terendam, kemudian campuran tersebut didiamkan selama 3 hari dan sesekali diaduk kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring.⁴²
3. Setelah dilakukan penyaringan, filtrat yang diperoleh kemudian etanolnya diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak kental *G. pseudochina* dengan konsentrasi 100%.⁴²

3. 8. 4 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak

Untuk memperoleh ekstrak *G. pseudochina* dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dapat dilakukan pengenceran dengan menggunakan rumus:⁴³

$$M_1.V_1 = M_2.V_2$$

Keterangan: M_1 : Molaritas sebelum pengenceran (%)

M_2 : Molaritas setelah pengenceran (%)

V_1 : Volume sebelum pengenceran (ml)

V_2 : Volume setelah pengenceran (ml)

Dalam penelitian ini pengenceran dilakukan dengan akuades steril sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. Masing-masing sampel memerlukan 5 ml larutan dalam setiap tabung reaksi, sehingga untuk satu konsentrasi dibutuhkan 25 ml larutan.

Pembuatan tiap-tiap konsentrasi berdasarkan rumus adalah sebagai berikut:

a. Konsentrasi 5% : $M_1.V_1 = M_2.V_2$

$$100\% . V_1 = 5\% . 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ ml}$$

Jadi pengencerannya: 1,25 ml ekstrak *G. pseudochina* ditambahkan 23,75 ml akuades.

b. Konsentrasi 10% : $M_1.V_1 = M_2.V_2$

$$100\% . V_1 = 10\% . 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Jadi pengencerannya: 2,5 ml ekstrak *G. pseudochina* ditambahkan 22,5 ml akuades.

c. Konsentrasi 15% : $M_1.V_1 = M_2.V_2$

$$100\% . V_1 = 15\% . 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = 3,75 \text{ ml}$$

Jadi pengencerannya : 3,75 ml ekstrak *G. pseudochina* ditambahkan 21,25 ml akuades.

d. Konsentrasi 20% : $M_1.V_1 = M_2.V_2$

$$100\% \cdot V_1 = 20\% \cdot 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Jadi pengencerannya : 5 ml ekstrak *G. pseudochina* ditambahkan 20 ml akuades.

e. Konsentrasi 25% : $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

$$100\% \cdot V_1 = 25\% \cdot 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = 6,25 \text{ ml}$$

Jadi pengencerannya : 6,25 ml ekstrak *G. pseudochina* ditambahkan 18,75 ml akuades.

3.8.5 Pembuatan Larutan Sodium Hipoklorit

Larutan *denture cleanser* kimia yang digunakan sebagai kelompok kontrol positif dalam penelitian ini adalah sodium hipoklorit 0,5% yang didapatkan dari pengenceran bahan pemutih pakaian (Bayclin) yang mempunyai kandungan aktif NaOCl 5,25%. NaOCl sebanyak 10 ml diencerkan dengan akuades steril 95 ml sehingga diperoleh larutan sodium hipoklorit konsentrasi 0,5% sebanyak 105 ml.⁴⁴

3.8.6 Pembuatan Biakan *S. aureus*

1. Koloni *S. aureus* yang digunakan didapat dari biakan yang ada pada Balai Besar Laboratorium Palembang dan diambil beberapa ose bakteri.
2. Bakteri yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan cara dilarutkan ke dalam 10ml media *Brain Heart Infusion*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.⁴⁵
3. Suspensi bakteri sebanyak 0,5 ml diambil dan diencerkan dengan akuades steril sampai mencapai kekeruhan tertentu dan disesuaikan dengan standar

0,5 Mc Farland (setara 150×10^6 CFU/ml) dan dimasukkan kedalam 35 tabung reaksi.⁴⁵

3.8.7 Saliva Steril

Saliva steril didapatkan dari Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Sriwijaya (Dengan kandungan: NaCl 0,702 g, KCN 0,221 g, NaHCO₃ 1,495 g, KCl 1,153 g, H₂NCONH₂ 1,100 g, Na₂HPO₄ 0,213 g, KH₂PO₄ 0,204 g).⁴⁶

3.8.8 Perlakuan Sampel¹³

1. Sebanyak 35 lempeng resin akrilik disterilisasi dengan direndam di dalam alkohol 70% selama 5 menit. Kemudian, sampel dimasukkan menggunakan pinset ke dalam saliva buatan sebanyak 20 ml di dalam cawan petri selama 1 jam untuk mengondisikan sampel sesuai dengan kondisi yang ada di rongga mulut.
2. Sampel diambil dengan pinset kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml suspensi *S. aureus* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Setiap sampel kemudian dibilas dengan dilewatkan pada 5 ml *phosphate buffer saline* sebanyak dua kali menggunakan pinset di dalam gelas *beaker*.
4. Setiap sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan perendaman (*G. pseudochina* konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%, sodium hipoklorit, dan akuades) sebanyak 5 ml. Lama waktu perendaman untuk semua kelompok perlakuan adalah 30 menit.

5. Setelah 30 menit semua sampel dikeluarkan dan masing-masing sampel dibilas kembali dengan dilewatkan dengan *phosphate buffer saline* sebanyak 2 kali untuk membersihkan dari larutan perendam.
6. Setelah dibilas, sampel dimasukkan ke dalam 10 ml NaCl 0,9% pada tabung reaksi dan digoyangkan selama 30 detik untuk melepaskan *S. aureus* yang melekat pada lempeng.
7. Sebanyak 0,1 ml suspensi *S. aureus* diambil menggunakan *micropipette*. Suspensi diteteskan pada cawan petri, kemudian dicampur dengan media *Plate Count Agar* cair yang masih hangat dan diratakan dengan memutar cawan petri. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

3.8.9 Penghitungan Jumlah Koloni *S.aureus*¹³

1. Setelah diinkubasi, setiap cawan petri dikeluarkan dan dilakukan penghitungan jumlah koloni *S. aureus* dengan *colony counter*.
2. Setiap bakteri yang tumbuh ditandai dengan spidol pada seluruh cawan petri dengan bantuan *colony counter*.
3. Jumlah bakteri yang terhitung dicatat dengan tambahan satuan $\times 10^2$ *Colony Forming Unit* per mililiter (CFU/ml).

3.9 Analisis Data

Untuk analisis hasil menggunakan *Statistical Package For The Social Sciences* (SPSS) versi 22. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* dan uji homogenitas *Levene test*. Jika sebaran data terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji parametrik, yaitu uji statistik ANOVA satu arah. Jika uji normalitas data menghasilkan $p < 0,05$ maka analisis data dilanjutkan dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak *G. pseudochina* dan larutan sodium hipoklorit 0,5% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada lempeng resin akrilik. Terakhir dilakukan uji beda lanjut (*post hoc test*) *Games-howell* untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan.⁴⁷

3.10 Alur Penelitian

