BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini mencangkup Ilmu Penyakit Gigi dan Mulut serta Ilmu Mikrobiologi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

1. Ruang lingkup tempat

   Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

2. Ruang lingkup waktu

   Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Mei 2015 atau sampai jumlah sampel terpenuhi.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*.

4.4 Sampel

Sampel penelitian ini meliputi koloni *S. mutans* yang berasal dari isolat gigi yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dan memenuhi kriteria inklusi serta eksklusi. Jumlah duplikasi dilakukan sebanyak lima kali.

4.4.1 Kriteria Inklusi

Koloni *S. mutans* yang tumbuh pada media *Brain Heart Infussion* dan *Blood Agar* setelah dipaparkan dengan perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

4.4.2 Kriteria Eksklusi

Koloni *S. mutans* yang tumbuh pada media BHI dan *Blood Agar* dengan disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi asap cair.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penitian ini adalah pertumbuhan koloni *S. mutans.*

4.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Unit	Skala
1	Konsentrasi asap cair Asap cair merupakan suatu hasil destilasi atau pengembunan dari uap hasil pembakaran tidak langsung maupun langsung dari bahan-bahan yang mengandung karbon serta senyawa lain, kemudian dibuat konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,5%, dan 0% dalam *aquades* yang ditambahkan media BHI. Dinyatakan dalam mg/cc.	Persen (%)	Ordinal
2	Kadar Hambat Minimum Larutan sampel dengan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (ditandai dengan kejernihan secara visual yang dinilai oleh pengamat secara independent).	Jernih/Keruh	Nominal
3	Kadar Bunuh Minimum Konsentrasi terkecil yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri dilakukan dengan hitung koloni.	Tumbuh/Tidak tumbuh	Nominal

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

1) Larutan induk dan asap cair dalam berbagai konsentrasi

   I : Larutan induk terdiri dari 0,74 gr BHI dan 2 cc asap cair.

   P1 : Asap cair 100% terdiri dari 1 cc larutan induk.

P2 : Asap cair 50% terdiri dari 1 cc larutan induk dan 1 cc BHI.

P3 : Asap cair 25% terdiri dari 1 cc larutan P2 dan 1 cc BHI.

P4 : Asap cair 12,5% terdiri dari 1 cc larutan P3 dan 1 cc BHI.

P5 : Asap cair 6,5% terdiri dari 1 cc larutan P4 dan 1 cc BHI.

P6 : Asap cair 0% terdiri dari 1 cc asap cair.

2) Larutan standar Mc Farland 0,5

3) Suspensi *S. mutans*

4) Media *blood agar*

Susunan media *blood agar* :

1)	Pepton	:	4 g
2)	NaCl	:	1 g
3)	Agar	:	2 g
4)	Aquades	:	100 cc
5)	pH	:	7,2
6)	Darah		

4.7.2 Alat

1) Cawan petri

2) Tabung reaksi

3) Rak tabung reaksi

4) Botol

5) Pipet dan mikropipet

6) Osse

7) Kapas

8) Lampu bunsen dan korek api

9) Timbangan bahan

10) Kompor gas

11) Kertas pH

12) Inkubator dengan suhu 37°C

4.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan berdasarkan uji eksperimental yang dilakukan oleh peneliti di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro merupakan data primer berupa hasil pertumbuhan koloni *S. mutans* pada media BHI dan *Blood agar* dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.8 Persiapan Alat, Bahan dan Media

Semua alat, bahan dan media yang digunakan pada penelitian disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi, dengan menggunakan autoclave pada temperatur 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit, yang kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 2 jam.

4.9 Cara Kerja

4.9.1 Pembuatan Suspensi *S. mutans*

Koloni *S. mutans* dari hasil kultur dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9% lalu disesuaikan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5

4.9.2 Uji Kadar Bunuh Minimum

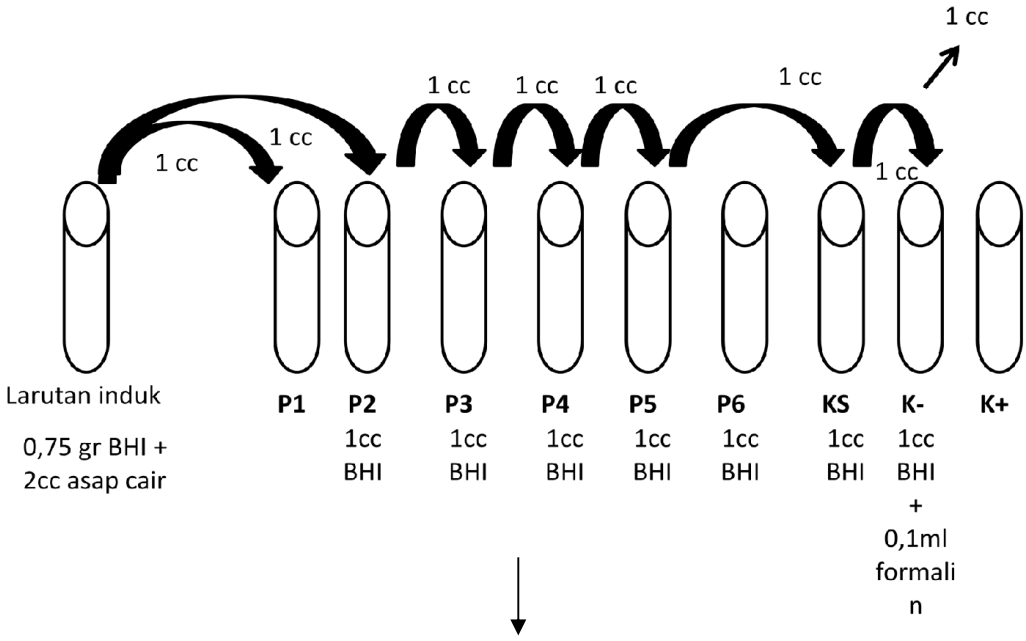
1) Disiapkan tabung reaksi steril
2) Tabung I sebagai larutan induk diisi bahan media Brain Heart Infusion (BHI) yang dilarutkan kedalam 2cc larutan sampel (asap cair)
3) Tabung P1 diisi 1 cc larutan induk.
4) Tabung P2 diisi 1 cc larutan induk dan 1 cc BHI.
5) Tabung P3 diisi 1 cc larutan dari P2 dan 1 cc BHI.
6) Tabung P4 diisi 1 cc larutan dari P3 dan 1 cc BHI.
7) Tabung P5 diisi 1 cc larutan dari P4 dan 1 cc BHI.
8) Tabung P6 diisi 1 cc BHI.
9) Tabung KS sebagai kontrol sampel diisi 1 cc larutan dari P5 dan 1 cc BHI.
10) Tabung K- sebagai kontrol negatif diisi 1 cc larutan dari KS dan 1 cc BHI. Ambil 1 cc kemudian buang. Menambahkan 0,1 cc formalin.
11) Tabung K+ sebagai kontrol positif diisi 1 cc BHI.
12) Menambahkan 0,1 cc suspensi bakteri ke dalam tabung P1, P2, P3, P4, P5, P6, K- dan K+.
13) Setiap nomor tabung dilakukan percobaan sebanyak lima kali.
14) Semua tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, kemudian diamati, dibandingkan dengan kontrol KHM (Kadar Hambat Minimum) ditentukan oleh tabung yang berisi konsentrasi

obat terendah yang masih menghambat pertumbuhan kuman (perbenihan tetap jernih)

4.9.3 Penentuan KBM (Kadar Bunuh Minimum)

1) Sediaan uji dari 4.9.4 diatas digoreskan pada blood agar sebanyak 2µl.
2) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, kemudian diamati konsentrasi terkecil dimana tidak terjadi pertumbuhan koloni kuman merupakan KBM.

4.10 Alur Penelitian



Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam

↓

Mengamati kekeruhan secara visual
(Menentukan KHM)

↓

Menggoreskan 2 µl sediaan dari suspensi yang jernih dari media *Blood Agar*

↓

Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam

↓

Hitung koloni

Gambar 10. Alur Penelitian

4.11 Analisis Data

Data yang dikumpulkan telah diedit, dikoding, ditabulasi. Uji normalitas dilakukan dengan uji Saphiro Wilk. Hasil uji normalitas didapatkan $P < 0.05$. Setelah dilakukan transformasi data tetap didapatkan persebaran data tidak normal. Uji nonparametrik Kruskal-Wallis dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada >2 kelompok. Karena didapatkan perbedaan pada setidaknya 2 kelompok maka dilanjutkan dengan uji Post-Hoc menggunakan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan. Pengolahan data dilakukan dengan SPSS *for windows*.