

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral bagian Mikrobiologi, Rumah Sakit Nasional Diponegoro (RSND), Universitas Diponegoro, Semarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

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

3.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini meliputi koloni *Porphyromonas gingivalis* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta dan memenuhi kriteria inklusi serta eksklusi. Jumlah duplikasi diketahui dengan rumus Federer.

Rumus federer :

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/5$$

$$(n-1) \geq 3$$

$$n \geq 3+1$$

$$n \geq 4$$

$$n = 5$$

Keterangan :

n : banyaknya ulangan

t : banyaknya perlakuan

Berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas, maka diperoleh $n = 5$, maka jumlah ulangan sebanyak 5 kali.

3.4.1 Kriteria Inklusi

Koloni *Porphyromonas gingivalis* yang tumbuh pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B), dan *Blood Agar* setelah dipaparkan dengan perlakuan dan diinkubasi pada lingkungan anaerob dengan menggunakan anaerob *GasPak*, pada suhu 37° C selama 24-48 jam.

3.4.2 Kriteria Eksklusi

Koloni *Porphyromonas gingivalis* yang tumbuh pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B), dan *Blood Agar* dengan disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi asap cair.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Porphyromonas gingivalis*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Unit	Skala
1.	Konsentrasi Asap Cair Asap cair merupakan suatu hasil kondensasi asap hasil pembakaran tidak sempurna dari kayu atau tempurung kelapa, kemudian dibuat konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 0% dalam <i>aquades</i> yang ditambahkan media BHI. Pada penelitian, menggunakan asap cair grade 1. 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 independen).	Jernih/ Keruh	Nominal
3.	Kadar Bunuh Minimum Konsentrasi terkecil yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri dilakukan dengan hitung koloni.	Jumlah Koloni	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

1) Larutan induk dan asap cair dalam berbagai konsentrasi. Asap cair diperoleh dari salah satu UKM (Usaha Kecil Menengah) bernama Asap Cair Madaniah di Yogyakarta.

I : Larutan induk terdiri dari 0,74 gr BHI-B 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 6,25% terdiri dari 1 cc larutan P4 dan 1 cc BHI.

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

2) Larutan standar Mc Farland 0,5

3) Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

4) Media *Blood Agar*

Susunan media *Blood Agar* :

1) Pepton : 4g

2) NaCl : 1g

3) Agar : 2g

4) Aquades : 100cc

5) pH : 7,2

6) Darah

3.7.2 Alat

- 1) Cawan Petri
- 2) Tabung Reaksi
- 3) Rak tabung reaksi
- 4) Botol
- 5) Pipet dan mikropipet
- 6) Osse steril
- 7) Kapas
- 8) Lampu bunsen dan korek api
- 9) Timbangan bahan
- 10) Kompor Gas
- 11) Kertas pH
- 12) Inkubator dengan suhu 37°C
- 13) Anaerob *GasPak*, Indikator anaerob, Anaerob *pouches*

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan berdasarkan uji eksperimental yang dilakukan oleh peneliti di Laboratorium Sentral bagian Mikrobiologi, Rumah Sakit Nasional Diponegoro (RSND), Universitas Diponegoro, Semarang merupakan data primer berupa hasil pertumbuhan koloni *Porphyromonas gingivalis* pada media BHI-B, dan *Blood Agar* dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

3.8 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.

3.9 Cara Kerja

3.9.1 Pembuatan Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

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

3.9.2 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

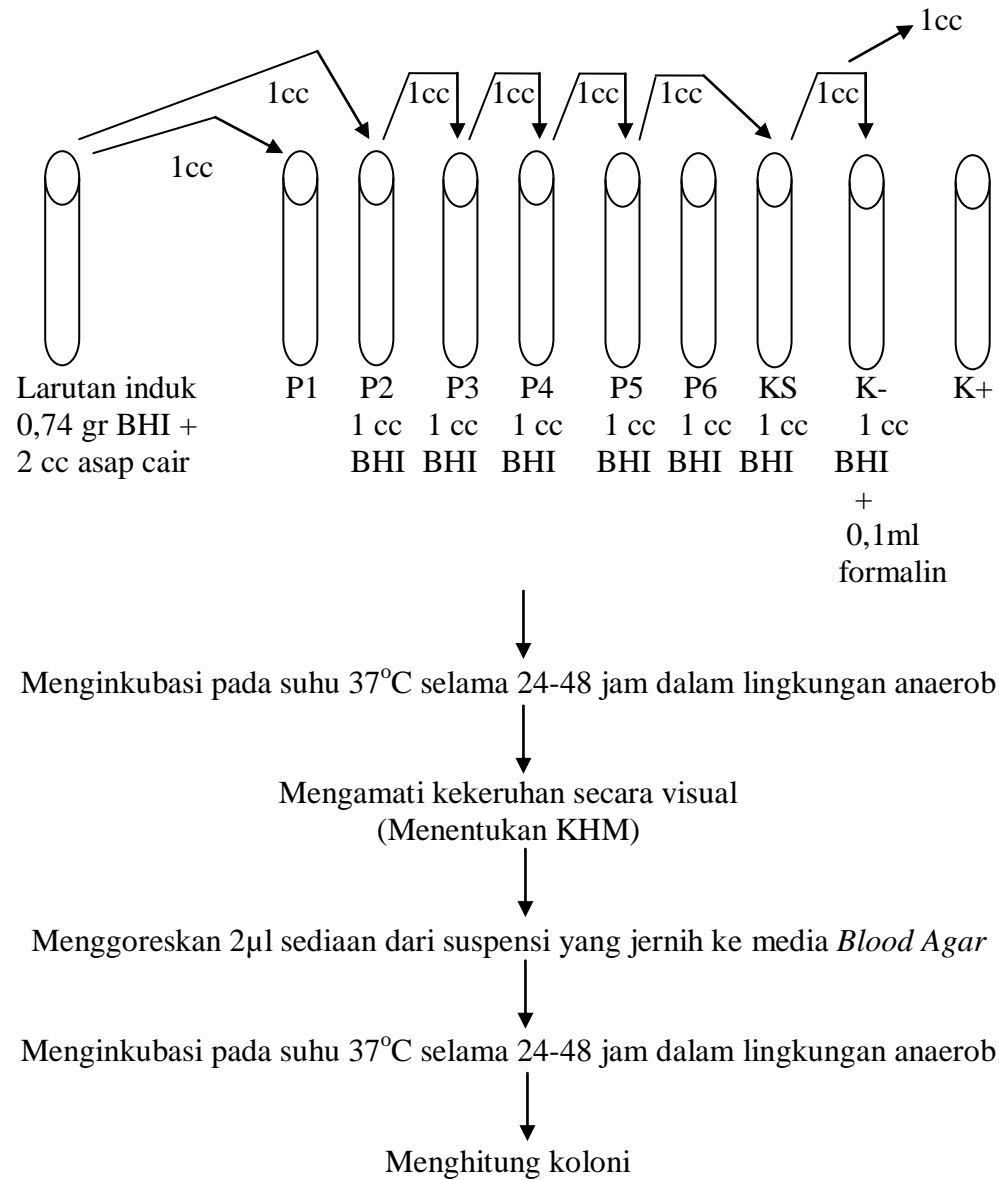
- 1) Menyiapkan tabung reaksi steril
- 2) Mengisi tabung I sebagai larutan induk dengan bahan media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang dilarutkan ke dalam 2 cc larutan sampel (asap cair).
- 3) Mengisi tabung P1 dengan 1 cc larutan induk.
- 4) Mengisi tabung P2 dengan 1 cc larutan induk dan 1 cc BHI.
- 5) Mengisi tabung P3 dengan 1 cc larutan P2 dan 1 cc BHI.
- 6) Mengisi tabung P4 dengan 1 cc larutan P3 dan 1 cc BHI.
- 7) Mengisi tabung P5 dengan 1 cc larutan P4 dan 1 cc BHI.
- 8) Mengisi tabung P6 dengan 1 cc BHI.
- 9) Mengisi tabung KS sebagai kontrol sampel dengan 1 cc larutan dari P5 dan 1 cc BHI.

- 10) Mengisi tabung K- sebagai kontrol negatif dengan 1 cc larutan dari KS dan 1 cc BHI. Mengambil 1 cc kemudian buang. Menambahkan 0,1 cc formalin.
- 11) Mengisi Tabung K+ sebagai kontrol positif dengan 1 cc BHI.
- 12) Menambahkan 0,1 cc suspensi bakteri ke dalam tabung P1, P2, P3, P4, P5, P6, K-, dan K+.
- 13) Melakukan percobaan sebanyak lima kali pada setiap nomor tabung.
- 14) Menginkubasi semua tabung tersebut pada suhu 37°C pada lingkungan anaerob dengan anaerob *GasPak* selama 24-48 jam, kemudian mengamati, membandingkan dengan kontrol KHM (Kadar Hambat Minimum) yang ditentukan oleh tabung yang berisi konsentrasi obat terendah yang masih menghambat pertumbuhan kuman (perbenihan tetap jernih).

3.9.3 Penentuan KBM (Kadar Bunuh Minimum)

- 1) Menggoreskan sediaan 3.9.2 diatas pada blood agar sebanyak 2 μ l.
- 2) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dalam lingkungan anaerob dengan anaerob *GasPak*, kemudian mengamati konsentrasi terkecil dimana tidak terjadi pertumbuhan koloni kuman, yang merupakan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian

