

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experimental design post test control only* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September-Desember 2017.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3.1 Pengulangan Sampel

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini berdasarkan perhitungan rumus (Loektito, 1998) didapatkan pengulangan:

$$\begin{array}{rcl}
 p(n-1) & \geq & 15 \\
 8(n-1) & \geq & 15 \\
 8n-8 & \geq & 15 \\
 8n & \geq & 23 \\
 n & \geq & 2,8
 \end{array}$$

(Dibulatkan ke atas menjadi 3)

Setelah dilakukan perhitungan, maka pengulangan yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak tiga kali pengulangan.

4.3.2 Variabel Penelitian

4.3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah bakteri yang disterilisasi dengan menggunakan *Dental Magic Box (Dentmox) with Ultraviolet Basis Sterilizing Innovation* dengan waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit, dan 20 menit.

4.3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar bunuh minimum (KBM) bakteri *Streptococcus mutans*.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

1. Alat sterilisasi (autoklaf)
2. Kompor
3. Botol kultur

4. Erlenmeyer 250 ml
5. Blue tip
6. Botol jam
7. Beaker glass 100 ml
8. Microtube
9. Jarum ose
10. Botol film
11. Gelas ukur 100 ml
12. Spatula
13. Cotton swab
14. Cawan disposable
15. Mikropipet 1 ml
16. Neraca digital
17. Shaker
18. Spektrofotometer

4.4.2 Bahan

1. Aquadest steril
2. Handscoon
3. Masker
4. Kapas
5. Kertas payung
6. Spidol
7. Label
8. Karet

9. NB
10. NA
11. PDA
12. Garam fisiologis 0,85%

4.5 Definisi Operasional

1. DENTMOX yang digunakan merupakan inovasi dari alat sterilisasi portable yang dibuat oleh kelompok PKM-KC lolos pendanaan dikti tahun 2016.
2. Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Kadar Bunuh Minimum (KBM) merupakan jumlah koloni terkecil pada agar hasil sterilisasi menggunakan DENTMOX yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
4. Kelompok perlakuan pengulangan adalah kelompok dengan variasi waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit, dan 20 menit.

4.6 Prosedur Pendahuluan

4.6.1 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka dilakukan serangkaian tes, antara lain tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif kokus dengan hasil positif berwarna ungu, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus aerus* dengan hasil negatif tidak terdapat gelembung dan tes *optochin* untuk membedakan

Streptococcus mutans dengan *Streptococcus pneumonia* dengan asil negatif dengan tidak adanya zona hambat disekitar *disk*.

4.6.1.1 Prosedur Pewarnaan Gram

- a. Dibuat sediaan (*slide*) pada gelas objek, dikeringkan diudara kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan diatas api Bunsen
- b. Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit
- c. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air
- d. Sediaan dituangi larutan lugol dan dibiarkan selama 1 menit
- e. Sisa lugol dibual dan dibilas dengan air
- f. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik
- g. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- h. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik
- i. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
- j. Dikeringkan dengan kertas penghisap
- k. Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah (Baron *et al.*, 1986)

4.6.1.2 Uji Katalase

- a. Buat suspense bakteri pada gelas objek
- b. Tambahkan 1 tetes larutan salin/aquadest steril pada gelas objek
- c. Tambahkan 1 ose koloni bakteri
- d. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3 %
- e. Amati gelembung-gelembung udara pada pembedihan. Bila gelembung tidak timbul, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi

bersifat katalase negatif. Tes katalase (-) menunjukkan *Streptococcus mutans* (Hadioetomo, 1990).

4.6.1.3 Uji Optochin

- a. Membagi *Chocolate Agar Plate* (CAP) menjadi empat kuadran
- b. Melakukan streaking penuh pada CAP
- c. Letakkan optochin disk ditengah inokulum dengan penjepit steril
- d. Mengatur posisi *disk* dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar
- e. Inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C dalam inkubator.
- f. Mengamati zona hambatan disekeliling disk. Jika zona ≥ 14 mm yang mengelilingi *disk* dengan diameter 6 mm dan zona ≥ 16 mm yang mengelilingi dengan diameter 10 mm, hasil tes positif dan diidentifikasi *Streptococcus pneumoniae*. Jika terdapat zona hambat < 14 mm dengan diameter disk 6 mm dan zona < 16 mm dengan diameter disk 10 m, maka hasilnya negatif dan bakteri ini diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans* (Forbes *et al.*, 2002).

4.6.1.4 Uji Hemolisis

- a. Melakukan *streaking* pada *Blood Agar Plate* (BAP)
- b. Dengan ose steril, specimen ditanam di media agar darah
- c. Inkubasi di incubator pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
- d. Amati perubaha warna yang terjadi.
- e. *Streptococcus mutas* dapat menunjukkan gamabaran hemolisis positif dengan zona kehijauan (alfa hemolisis), zona transparan (beta hemolisisi), atau tidak ada perubahan warna pada pertumbuhan bakteri (gamma hemolisis) (Balley dan Scott's, 2002).

4.6.1.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

- a. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi
- b. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^8$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi dengan konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^8$ hingga $2,5 \times 10^8$ CFU/ml (Setyawan, 2012).

4.6.2 Prosedur Sterilisasi

1. Menyiapkan alat dan bahan.
2. Membuat media untuk kultur bakteri.

Pembuatan media NA: 20 gram NA instan ditimbang dalam neraca digital kemudian NA dilarutkan dalam 1000 ml aquadest. Larutan dihomogenkan dengan cara dipanaskan hingga masak (larutan bening dan mendidih) dalam beaker glass. Setelah itu, larutan NA dipindahkan ke erlenmeyer dan ditutup dengan kapas hingga vakum.

3. Membuat media perkembangbiakan bakteri.

Pembuatan media NB: beef ekstrak 10 gram, pepton 10 gram, NaCl 5 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest. Larutan dihomogenasi dengan cara dipanaskan hingga masak (larutan bening dan mendidih) dalam beaker glass. Kemudian larutan NB dipindahkan ke erlenmeyer dan ditutup dengan kapas hingga vakum.

4. Melakukan sterilisasi alat dan media kultur serta perkembangbiakan bakteri.

Seluruh meja perkembangbiakan dan media kultur disterilkan dengan autoklaf 121°C, 1 atm selama 15 menit. Setelah steril, NA dituangkan dalam cawan petri disposable steril untuk perlakuan, atau di dalam tabung reaksi miring sebagai stok kultur bakteri.

5. Mengkulturkan bakteri *Streptococcus mutans*.

Hasil pembuatan media NA dituangkan dalam tabung reaksi steril kemudian dimiringkan. Setelah mengeras, ditunggu 1 hari agar tidak ada uap di dalam tabung. 1 oose kultur bakteri digoreskan zigzag pada permukaan agar miring tersebut. Ditunggu 24 jam hingga terbentuk koloni bakteri.

6. Melakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

Setelah kultur bakteri tumbuh, 1 oose isolate diambil dan dimasukkan ke dalam media kultur NB steril yang sudah dibuat secara aseptis. Kultur digojog dalam shaker 120 rpm selama 6 jam dengan suhu 30°C.

7. Menyamakan kekeruhan dengan $\lambda = 625 \text{ nm}$.
8. Melakukan pengenceran menggunakan garam fisiologis 0,85% dengan metode dilusi sebanyak lima kali.
9. Menuangkan media NA untuk *Streptococcus mutans* pada cawan disposable, sejumlah kelompok perlakuan dan juga pengulangan serta ditunggu hingga mengeras.
10. Memasukkan cawan disposable yang telah diberi bakteri ke dalam DENTMOX dengan rentan waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit.

11. Mengoleskan bakteri dengan *cotton swab* di atas media secara merata.
12. Melakukan inkubasi cawan disposable yang telah dimasukkan ke dalam DENTMOX selama 24 jam dengan suhu 37°C.
13. Mengamati dan menghitung koloni bakteri.

4.6.3 Pembagian Kelompok Perlakuan untuk Penelitian Pendahuluan

Kelompok kontrol negatif: kelompok kontrol negatif yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang tidak dilakukan sterilisasi dengan DENTMOX.

Kelompok 1: kelompok perlakuan A yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 5 menit.

Kelompok 2: kelompok perlakuan B yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 10 menit.

Kelompok 3: kelompok perlakuan C yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 15 menit.

Kelompok 4: kelompok perlakuan D yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 20 menit.

4.6.4 Pembagian Kelompok Perlakuan untuk Pengulangan

Kelompok kontrol negatif: kelompok kontrol negatif yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang tidak dilakukan sterilisasi dengan DENTMOX.

Kelompok 1: kelompok perlakuan A yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 5 menit.

Kelompok 2: kelompok perlakuan B yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 10 menit.

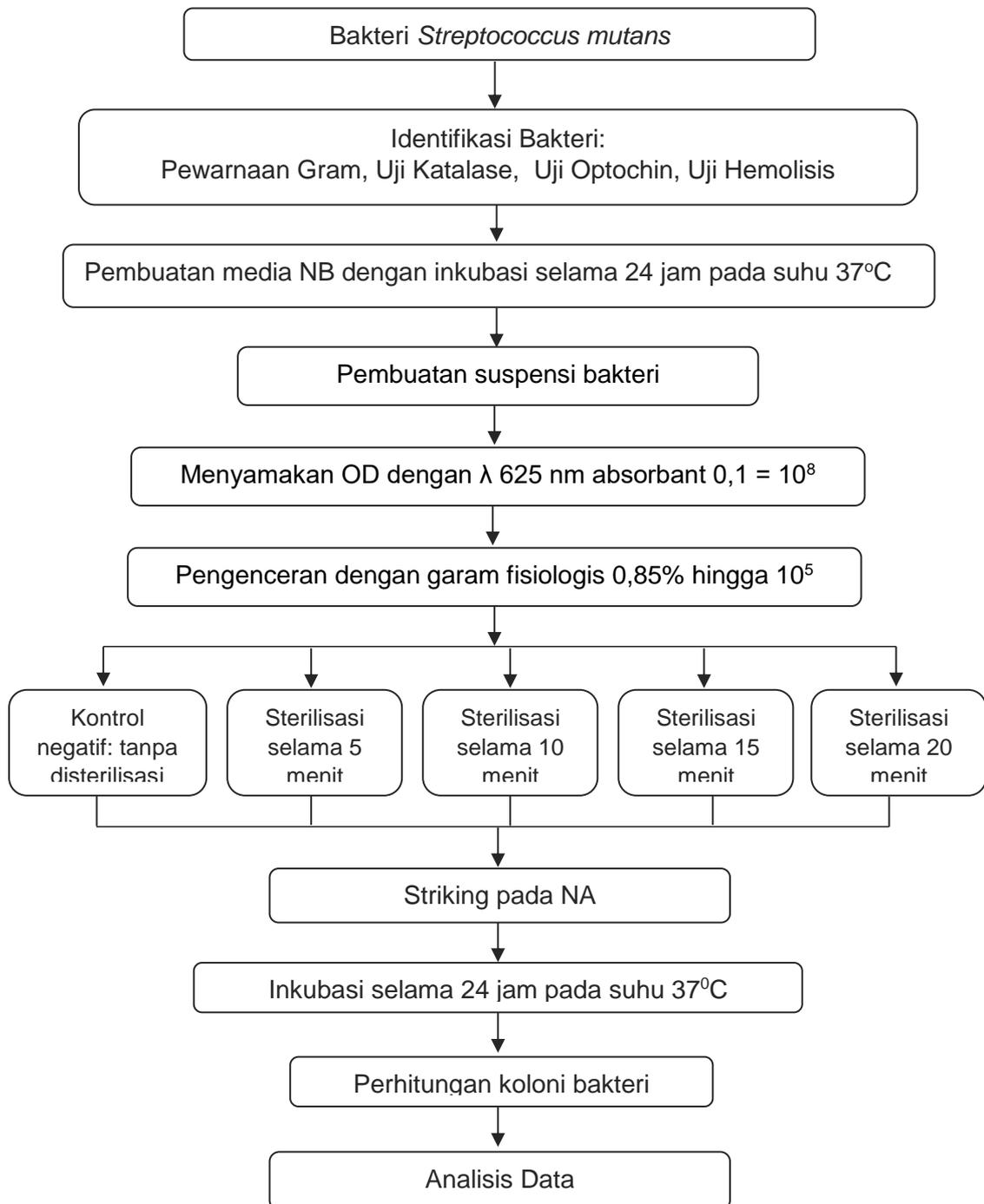
Kelompok 3: kelompok perlakuan C yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 15 menit.

Kelompok 4: kelompok perlakuan D yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang disterilisasi dengan menggunakan DENTMOX selama 20 menit.

4.6.5 Penghitungan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Kadar bunuh minimum (KBM) ditentukan dengan perhitungan koloni bakteri dari hasil striking pada NA (Nutrient Agar) (Struthers *et al.*, 2008).

4.7 Skema Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Uji ini menggunakan uji *Kolmogorov-Sminov* dan uji *Levene*. Bila data normal dan homogen, maka akan menggunakan uji komparasi *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* dilakukan menggunakan *Tukey HSD*. Uji korelasi digunakan untuk melihat ada atau tidaknya korelasi antar variabel dan melihat bentuk korelasinya. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Pearson*. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara waktu yang digunakan untuk sterilisasi menggunakan Dentmox terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Uji regresi linier dilakukan untuk melihat seberapa besar kontribusi variabel independen dalam menyebabkan perubahan di variabel dependen.

Bila hasil uji normalitas dan homogenitas varian data menunjukkan bahwa data tidak tersebar normal dan atau tidak homogen, maka analisis data yang akan digunakan adalah uji komparasi *Kruskal- Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* dilakukan menggunakan *Mann Whitney*. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk *Windows*.