

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratoris*, dengan rancangan penelitian *pretest-posttest only control group design*.

#### B. Populasi dan Sampel Penelitian

##### 1. Subjek penelitian

###### a. Populasi target

Mahasiswa FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

###### b. Populasi terjangkau

Subjek yang dipakai dalam penelitian ini berjumlah 10 subjek (Sumono & Wulan, 2009).

##### 2. Cara pengambilan sampel

*Purposive* yaitu sampel diambil secara acak tidak berdasarkan kelompok, strata, atau acak tetapi dengan pertimbangan tertentu (kriteria inklusi dan eksklusi) (Saryono, 2011).

##### 3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

###### a. Kriteria Inklusi

- 1) Tidak dibedakan jenis kelamin (Sumono & Wulan, 2009)
- 2) Telah mengisi *informed consent* (Sumono & Wulan, 2009)

4) OHI-S (skor  $\leq 2$ ) (Sumono & Wulan, 2009).

5) Daun sirsak (*Annona Muricata L.*) yang sudah tua dengan warna hijau tua, dan panjang daun  $\pm$  8-16 cm dan 3-7 cm.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Memiliki kelainan sistemik (diabetes mellitus, jantung, darah tinggi)
- 2) Sedang hamil
- 3) Menggunakan alat ortodontik dan prothesa
- 4) Merokok
- 5) Sedang xerostomia
- 6) Sedang mengkonsumsi antibiotic

**C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi

Lokasi pengambilan saliva dilakukan di ruang Laboratorium Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian dilakukan selama satu minggu pada bulan oktober tahun 2013.

**D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel pengaruh

- 1) *Annona Muricata L.* konsentrasi 100%

- 2) Obat kumur *chlorhexidine gluconate* 0,2% (sebagai kontrol positif)
- 3) Aquades steril (sebagai kontrol negatif)

b. Variabel terpengaruh

Variabel terpengaruh pada penelitian ini adalah jumlah koloni *Streptococcus mutans*.

c. Variabel terkendali

- 1) Durasi berkumur 60 detik (Sumono & Wulan, 2009)
- 2) Proses pengenceran saliva
- 3) Volume obat kumur 10 ml (Sumono & Wulan, 2009)
- 4) Media pertumbuhan *Streptococcus mutans* yaitu *Trypton Soya Agar*
- 5) Kondisi inkubasi 37<sup>0</sup>C
- 6) Adanya kontaminasi pada saat pembuatan infusa

## 2. Definisi Operasional

- a. Infusa daun *Annona muricata* L. adalah pengambilan zat aktif dalam daun *Annona muricata* L. yang diambil dengan proses infusa. Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan mencari simplisia nabati dengan air pada suhu 90<sup>0</sup> selama 15 menit.
- b. Obat kumur *chlorhexidine* adalah obat kumur *chlorhexidine gluconate* dengan konsentrasi 0,2% sebagai kontrol positif.

4. Infusa daun *Annona muricata* L. adalah sediaan yang dihasilkan untuk berkumur sebagai

- d. *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang banyak ditemukan pada lesi karies manusia dan berperan penting dalam proses terjadinya karies yang diambil dari subyek.
- e. Saliva adalah saliva yang diambil sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan.
- f. Efektivitas adalah kemampuan infusa daun sirsak untuk menurunkan jumlah koloni bakteri setelah penggunaan infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang dimanakan untuk berkumur

l. vertek

m. Oven

n. Leminer airflow.

## 2. Bahan penelitian

a. Infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) konsentrasi 100%.

b. NaCl

c. *Aquadest steril*

d. Medium padat : TSA

## F. Cara Penelitian

Tahapan penelitian sebagai berikut :

### 1. Tahap persiapan awal :

a. Pemilihan dan penentuan subyek (berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi).

b. *Briefing* untuk semua subyek penelitian, diantaranya : perlakuan yang akan diberikan, jadwal penelitian dan jalannya penelitian.

c. Subyek bersedia untuk menandatangani *informed consent*.

d. Persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian.

### 2. Persiapan pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Pembuatan Infusa daun sirsak

Pembuatan infusa berdasarkan Farmakope Indonesia IV : Infusa dibuat dari daun sirsak 10% b/v dengan cara daun sirsak (*Annona muricata*

L.) dihaluskan, ditimbang, dan dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup, dicuci dengan

air mengalir setelah itu dikeringkan dengan sinar matahari menggunakan bantuan kain hitam yang sebelumnya diangin-angikan terlebih dahulu. Setelah daun kering kemudian daun diblender. Serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) seberat 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa, ditambahkan aquadest 120 ml (100 + 20 ml air ekstrak). Serbuk daun sirsak yang telah ditambahkan aquadest dipanaskan menggunakan pemanas air selama 15 menit terhitung setelah suhu dalam panci  $90^{\circ}$  C, sambil sesekali diaduk. Disaring dengan menggunakan kain flannel, dijadikan 100 ml infusa. Jika volume kurang dari 100 ml dapat ditambahkan air panas yang dilewatkan pada ampas daun yang diperas 100 ml infusa daun sirsak (Sari dkk., 2010).

3. Pengumpulan subjek berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi untuk melakukan pengambilan saliva.

4. Persiapan sebelum perlakuan

Pengambilan saliva dilakukan pada waktu pagi hari sebelum subyek menyikat gigi dengan syarat : malam sebelum dilakukan perlakuan subyek tidak diperbolehkan makan setelah sikat gigi.

5. Cara pengambilan saliva sebelum dan sesudah perlakuan

Pada hari 1 : subyek diberi perlakuan dengan infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebanyak 10 ml, selama 60 detik. Kemudian subyek diinstruksikan untuk meludahkan saliva setiap 2 menit sampai total waktu 3

Pada hari 2 : subyek diberi perlakuan dengan *chlorhexidine gluconate* 0,2% sebanyak 10 ml, selama 60 detik. Kemudian subyek diinstruksikan untuk meludahkan saliva setiap 2 menit sampai total waktu 3 kali meludah dan saliva ditampung di pot saliva.

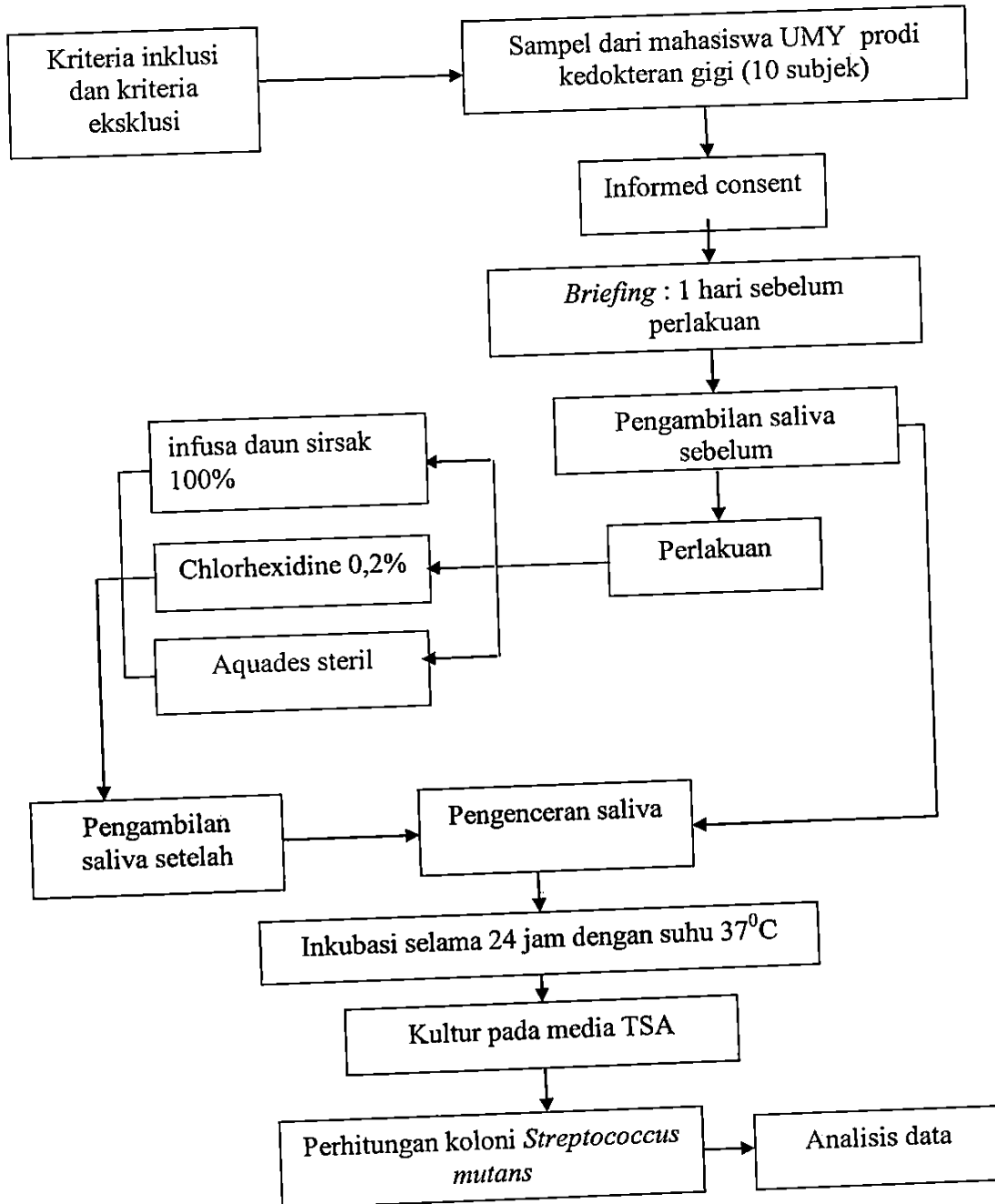
Pada hari 3 : subyek diberi perlakuan dengan *aquadest steril* sebanyak 10 ml, selama 60 detik. Kemudian subyek diinstruksikan untuk meludahkan saliva setiap 2 menit sampai total waktu 3 kali meludah dan saliva ditampung di pot saliva (Bhat dkk., 2012).

5. Pengenceran saliva diencerkan dengan faktor pengenceran  $10^4$ . Saliva diambil satu milliliter (1 ml), dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 ml NaCl kemudian dilakukan deret pengenceran sampai  $10^4$  (Fadlilah dkk., 2010).
6. Saliva yang diencerkan dibiakan pada media agar TSA dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam suasana anaerob selama 24 jam (Sumono & Wulan, 2009). Kemudian dilakukan perhitungan koloni bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan *colony counter*. *Streptococcus mutans* dapat dibedakan dengan koloni bakteri lain dengan melihat morfologi koloni pada media agar. Gambaran koloni *Streptococcus mutans* pada media agar mempunyai diameter 1-5 mm, permukaan koloni bebutir kasar, licin, menyerupai bunga kasar dengan pusat menyerupai kapas, konsistensi koloni keras dan sangat lengket warna koloni seperti salju yang membeku, agak buram mengkilap (opaque), kuning buram dengan lingkaran putih. Sedangkan pada tepi koloni

7. Perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan alat *Colony counter* yang dilakukan pada plate dengan jumlah 30 sampai 300 koloni. Jumlah ini menggambarkan jumlah koloni tiap sampel. Koloni yang ditentukan, dihitung dengan syarat : Satu koloni dihitung 1 koloni. Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni. Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni. Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni. Koloni yang terlalu besar (lebih besar dari setengah luas cawan) tidak dihitung. Koloni yang besarnya kurang dari setengah luas cawan dihitung 1 koloni. Jumlah organisme yang terdapat dalam sample dengan cara mengkalikan jumlah koloni yang terbentuk dengan faktor pengenceran (Sulistiyani dkk. 2010)



### G. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur penelitian

## H. Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Kemudian data dianalisis dengan menggunakan *paired t-test*. Data yang digunakan pada uji *paired t-test* yaitu selisih data sebelum dan sesudah dilakukan perlakuan.

Setelah itu hasil dari uji *paired t-test* dilanjutkan dengan ANNOVA untuk membandingkan ketiga perlakuan yaitu infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.), *chlorkexsidine gluconate* 0,2% dan aquadest steril. Bila data yang didapatkan tidak normal maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Dilanjutkan dengan *post hoc turkey*, kemudian jika data tidak normal menggunakan *Mann Withney*.

## I. Etika Penelitian

Penelitian ini dilakukan setelah sebelumnya subyek penelitian diberi penjelasan mengenai jalannya penelitian serta maksud dan tujuan penelitian. Kepada subyek penelitian dijelaskan juga secara singkat bahwa penelitian yang dilakukan eksperimental laboratoris, adanya intervensi terhadap subyek dan data yang dikumpulkan akan dijaga kerahasiaannya. Penelitian ini meminta subyek untuk menandatangani *informed consent* sebagai tanda