

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode studi eksperimental, yaitu penelitian kuantitatif yang menghasilkan bukti tentang hubungan dan efek diantara variabel-variabel penelitian. Ini merupakan tujuan utama dari penelitian eksperimen yang mendeterminasi apakah satu variabel memiliki efek terhadap variabel yang lain (Swarjana, 2012). Jenis studi eksperimental yang digunakan adalah tipe *post test with control group design*, yaitu metode perlakuan sampel secara acak dengan disertai grup terkontrol dan perhitungan pada akhir penelitian (Samoke, 2012).

4.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah plat basis akrilik yang telah dikontaminasi *Candida albicans*. Sampel dibagi dalam tujuh kelompok, yaitu 5 kelompok berdasarkan konsentrasi perendaman yang berbeda dan dua kelompok kontrol.

Sebelumnya telah dilakukan penelitian dengan topik yang sama. Praja (2009) menyatakan bahwa konsentrasi infusa daun sirih 25% telah memiliki pengaruh untuk mengurangi jumlah *Candida albicans*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi infusa daun sirih 25% telah memiliki efek antifungi terhadap kehidupan *Candida albicans*. Hal ini juga didukung dengan penelitian Hidir (2010) yang melakukan penelitian mengenai efek antifungi infusa daun sirih terhadap *Candida albicans*, menggunakan konsentrasi 20%, 30%, dan 40%. Hasil

penelitian Hidir membuktikan bahwa seluruh konsentrasi memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

Namun peneliti menemukan hasil penelitian lain yang memiliki perbedaan kesimpulan. Merlin (2005) menyatakan dari hasil penelitiannya bahwa konsentrasi infusa daun sirih di bawah 50% belum memiliki efek antifungi terhadap *Candida albicans*. Penelitian Diah Sudiarti (2010) juga menyatakan bahwa konsentrasi infusa daun sirih yang memiliki daya antifungi adalah pada konsentrasi 65%. Karena itulah peneliti menggabungkan seluruh konsentrasi dari penelitian sebelumnya untuk membuktikan konsentrasi berapakah yang berpengaruh dan memiliki daya antifungi terhadap *Candida albicans* secara in vitro.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% yang mencakup seluruh *range* dari berbagai konsentrasi pada penelitian sebelumnya. Peneliti juga menambahkan aquades yang tidak memiliki daya fungisid sebagai kontrol negatif, dan *chlorhexiddine gluconate* 0,2% yang memiliki daya fungisid tinggi sebagai kontrol positif.

Pembagian kelompok sampel penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :

- Kelompok I : Perendaman dengan infusa daun sirih pada konsentrasi 20%.
- Kelompok II : Perendaman dengan infusa daun sirih pada konsentrasi 40%.
- Kelompok III : Perendaman dengan infusa daun sirih pada konsentrasi 60%.
- Kelompok IV : Perendaman dengan infusa daun sirih pada konsentrasi 80%.
- Kelompok V : Perendaman dengan infusa daun sirih pada konsentrasi 100%.
- Kelompok VI : Perendaman dengan kontrol negatif, yaitu aquades steril

Kelompok VII : Perendaman dengan kontrol positif, yaitu *Chlorhexiddine gluconate 0,2%*.

Waktu perendaman kelompok sampel yang digunakan dibuat sama, yaitu 30 menit. Pemilihan waktu tersebut berdasarkan jumlah waktu alat ortodonti lepasan berada di luar mulut (15-30 menit/kali lepas) dan merupakan waktu efektif efek fungisid dari bahan pembersih gigi tiruan (Wijayanti, 2012). Jumlah ulangan dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus Federer, karena rumus ini digunakan pada penentuan jumlah sampel untuk penelitian eksperimental (Ghazali, 2011). Rumus tersebut yaitu :

$$(t-1) \times (r-1) = 15$$

Gambar 4.1 Rumus perlakuan ulang sampel Federer

Sesuai rumus tersebut, maka perhitungan yang berlaku adalah :

$$(t-1) \times (r-1) = 15$$

$$(7-1) \times (r-1) = 15$$

$$6(r-1) = 15$$

$$r = 3,5 = 4$$

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan dalam sampel

r = Jumlah perlakuan ulang

Berdasarkan perhitungan sesuai rumus pada gambar 4.1, maka dalam penelitian ini menggunakan empat kali pengulangan tiap konsentrasinya dengan dua sampel kontrol (Rahmawati, 2012)

4.3. Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah :

4.3.1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel independen dari penelitian ini adalah konsentrasi perendaman basis akrilik ortodonti lepasan dalam infusa daun sirih (*Piper betle L.*)

4.3.2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah sel *Candida albicans*

4.3.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain : waktu perendaman dalam infusa daun sirih, media penggeraman *Candida albicans*, jenis basis akrilik, suhu lingkungan perendaman, serta sterilisasi alat dan bahan.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Ruang *Skill Lab B* PSPDG dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2015.

4.5. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- 4.5.1. Perendaman merupakan proses, cara, perbuatan memasukkan sesuatu ke dalam air (Kamus Besar Bahasa Indonesia, 2013). Pada penelitian ini objek perendaman adalah basis akrilik alat ortodonti lepasan dengan media rendam infusa daun sirih (*Piper betle L.*). Lama perendaman sendiri merupakan waktu kontak antara plat akrilik yang mengandung

Candida albicans dengan infusa daun sirih. Lama perendaman yang digunakan adalah 30 menit. Perendaman dilakukan dalam suhu inkubasi 37 derajat *celcius*.

- 4.5.2. Basis akrilik dalam penelitian ini adalah plat dasar dari piranti ortodonti lepasan. Jenis basis akrilik yang digunakan adalah *heat cured* atau basis akrilik polimerisasi panas yang dipoles salah satu sisinya. Basis akrilik yang digunakan dalam penelitian dibuat dengan prosedur dan waktu yang sama sehingga diharapkan memiliki tingkat perbedaan yang tidak signifikan.
- 4.5.3. Infusa daun sirih adalah hasil perebusan selama 15 menit pada suhu 90° (Praja, 2009). Pada penelitian ini hasil infusa 100% kemudian disaring untuk membuat kemudian diencerkan sesuai konsentrasi yang dibutuhkan.
- 4.5.4. Jumlah sel *Candida albicans* adalah hasil perhitungan rumus dari nilai absorbans *C. albicans* yang didapatkan dari perhitungan spektrofotometer.
- 4.5.5. Sterilisasi alat dan bahan adalah suatu usaha untuk membebaskan alat-alat atau bahan-bahan dari segala macam kehidupan, terutama kehidupan mikroorganisme.

4.6. Bahan Penelitian

Dalam penelitian menggunakan bahan-bahan sebagai berikut :

- a. Basis akrilik heat cured
- b. Gips tipe III
- c. *Vaseline*
- d. Daun Sirih 200 gram
- e. *SDB*
- f. *Candida albicans*

- g. Larutan *Phosphat Buffer Saline* /PBS pH 7,0
- h. Saliva steril 100 cc
- i. Aquades
- j. Alkohol 95 %
- k. Khlorheksidin 0,2%
- l. NaCl

4.7. Instrumen Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan alat-alat sebagai berikut :

- a. Tempat mencampur resin akrilik
- b. Vibrator
- c. Kuvet
- d. Hidraulik press.
- e. Inkubator
- f. Petri steril
- g. Bunsen
- h. Pinset steril
- i. Autoklaf
- j. Tabung reaksi
- k. Kertas saring
- l. Erlenmeyer
- m. Label
- n. Stopwatch
- o. Jarum ose
- p. Kapas
- q. Mikropipet



- r. Kertas amplas
- s. Kamera merk Samsung\
- t. Tabung Falcon

4.8. Rancangan Operasional Penelitian

4.8.1. Pembuatan Akrilik

- a. Model cetakan dibuat dengan menggunakan malam merah dengan ukuran 10x10 mm dan ketebalan 2mm, kemudian ditanam dalam kuvet bagian bawah dengan gips dan ditunggu hingga mengeras. Setelah itu dilakukan pemolesan dengan *vaseline*.
- b. Membuat kontra dengan memasang kuvet atas dan diisi gips. Setelah keras kontra dipisahkan dengan model.
- c. Dilakukan *boiling out* sampai bersih sehingga terbentuk *mould* yang akan diisi akrilik
- d. Bahan resin akrilik dengan perbandingan bubuk dan cairan sesuai dengan aturan pabrik disiapkan dalam mangkok porselen kemudian diaduk pada suhu kamar ($\pm 27^{\circ} \text{C}$), setelah adonan mencapai konsistensi *dough stage* dimasukkan ke dalam mould yang telah diulasi dengan bahan separasi.
- e. Kuvet ditutup kemudian dipres dengan hidraulik press, kuvet dibuka dan kelebihan akrilik dipotong kemudian kuvet ditutup dan dipress kembali. Selanjutnya kuvet dipindahkan pada klem/alat press kecil.
- f. Proses Kuring

- f.1. Kuvet yang berisi akrilik dimasukkan ke dalam curing unit. Proses curing dilakukan dengan suhu 100° C selama 60 menit (sesuai aturan pabrik).
- f.2. Setelah proses curing selesai, kuvet didiamkan sampai dingin, plat akrilik dikeluarkan dari kuvet.

4.8.2. Identifikasi *Candida albicans*

4.8.2.1. Pewarnaan gram

- a. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- b. Satu ose (1 µl) aquadest steril ditetaskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan jamur yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquadest pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquadest.
- c. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- d. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan ditetesi safranin selama ½ menit (30 detik). Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- h. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

- i. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah. Bila (+) maka ditemukan sel berbentuk oval dan *budding*.
- j. Hasil positif: *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif) (Kusriawati, 2013).

4.8.2.2. Uji *germinating tube*

- a. Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- b. Dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mamalia/putih telur/plasma 0,5 ml.
- c. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1,5 sampai 2 jam.
- d. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- e. Diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.
- f. Dicari bentukan *germ tube* dan atau *pseudohifa* khas *Candida albicans* (Kusriawati, 2013).

4.8.3. Pembuatan suspensi *Candida albicans*

Candida albicans yang dipakai diambil dari stok *Candida albicans* dengan cara sebagai berikut : *Candida albicans* diambil menggunakan ose kemudian ditanam ke dalam *Sabouraud' dextrose agar*, inkubasi selama 24 jam, dengan suhu 37° *celcius*. Kemudian membuat suspensi *Candida albicans* dengan cara dilarutkan dalam NaCl fisiologis 0,85 %. Kekeruhan suspensi *Candida albicans* disesuaikan dengan standar larutan 10⁸ *Mc Farland* untuk memperoleh suspensi fungi yang mengandung 10⁶ *CFU/ml*. Suspensi ini yang dipakai untuk

kontaminasi pada basis akrilik (Rahmawati, 2012). Jumlah tabung suspensi yang dibuat sesuai dengan jumlah sampel yaitu 28 tabung.

4.8.4. Pembuatan Infusa Daun Sirih

Infusa daun sirih dibuat dengan mencampur 200gram daun sirih dengan 200ml akuades steril. Daun sirih yang sudah dicuci dan dipotong kecil kemudian dimasukkan dalam *beaker glass* bersamaan dengan akuades steril. *Beaker glass* kemudian dimasukkan dalam panci berisi air mendidih. Suhu dalam *beaker glass* dikontrol hingga 90° C, kemudian mulai dilakukan perhitungan waktu selama 15 menit. Setelah waktu habis, beaker glass diangkat dan infusa disaring menggunakan kertas saring.

Infusa ini memiliki konsentrasi 100%, untuk kemudian dibagi dalam 20 wadah berbeda, serta diberi label. Pembagian ini memerlukan pengenceran dengan aquades steril sesuai dengan jumlah konsentrasi yang diperlukan.

Konsentrasi 20%	: 1 ml infusa daun sirih + 4 ml aquades steril
Konsentrasi 40%	: 2 ml infusa daun sirih + 3 ml aquades steril
Konsentrasi 60%	: 3 ml infusa daun sirih + 2 ml aquades steril
Konsentrasi 80%	: 4 ml infusa daun sirih + 1 ml aquades steril
Konsentrasi 100%	: 5 ml infusa daun sirih.

4.8.5. Pembuatan saliva steril

Larutan saliva buatan (buffer) McDougall (campuran 58,80g NaHCO₃, 48g Na₂HPO₄.7H₂O, 3,42g KCl, 2,82g NaCl, 0,72g MgSO₄.7H₂O, 0,24g CaCl₂ dalam 6 liter akuades). Penggunaan saliva buatan penting untuk mempertahankan pH supaya tetap berada dalam kisaran normal (Jayanti, 2013).

4.8.5. Perlakuan sampel

- Plat resin akrilik dicuci di bawah air mengalir untuk mengurangi sisa monomer kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* 121 derajat *celcius* selama 18 menit.

- b. Plat akrilik direndam dalam saliva steril 1 jam, kemudian dibilas PBS dua kali.
- c. Selanjutnya plat resin akrilik polimerisasi panas dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi *Candida albicans* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 derajat *celcius*.
- d. Basis akrilik yang telah dikontaminasi dengan *Candida albicans* kemudian dipindahkan ke dalam tabung falcon yang berisi 5 ml infusa daun sirih berbagai konsentrasi dan kelompok kontrol.
- e. Basis akrilik direndam selama 30 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan PBS 2x tiap 15 detik.
- f. Basis akrilik kemudian dimasukkan dalam 10ml *Saboroud dextrose broth*, kemudian dilanjutkan dengan vibrasi dengan *vortex* selama 30 detik untuk melepaskan *Candida albicans* dari basis akrilik
- g. Melakukan perhitungan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer, untuk kemudian diolah sesuai rumus :

$$\text{Jumlah sel} = \frac{(\text{Absorbansi media+kuman}) - (\text{Absorbansi media tanpa kuman}) \times 3.10^6}{\text{Absorbansi Mc Farland}}$$

Keterangan :

Nilai absorbansi media *Saboroud dextrose broth* tanpa kuman = 0,00

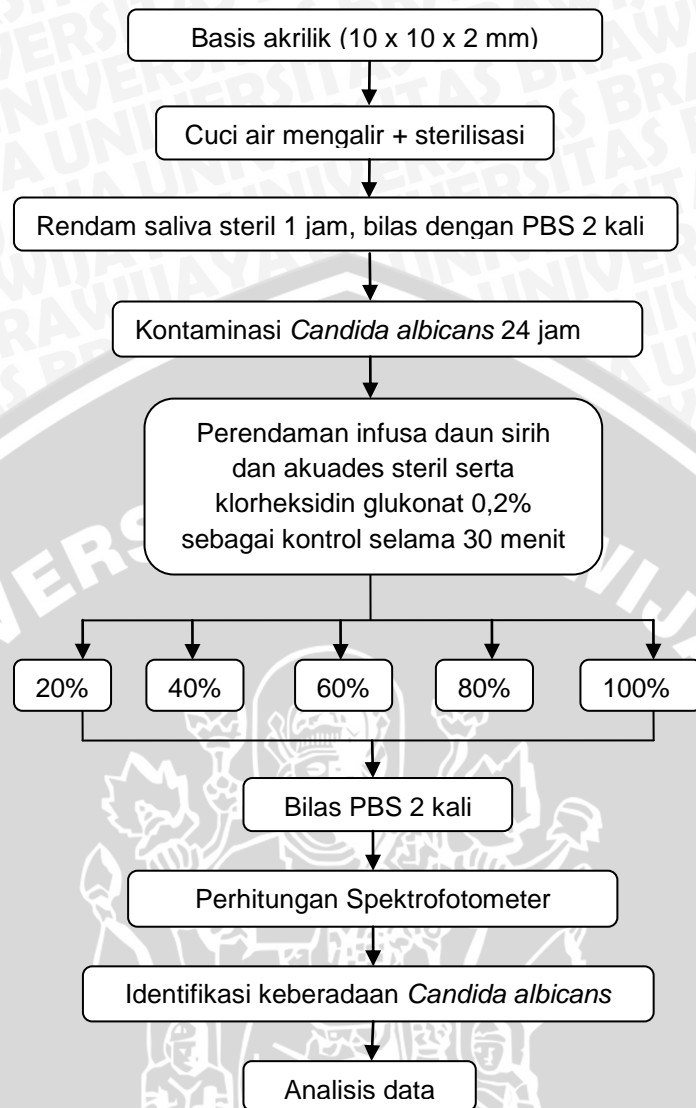
Nilai absorbansi Mc Farland = 0,15

(Wijayanti, 2012).

- h. Melakukan analisis data

4.9. Alur Penelitian

Alur penelitian berjudul “Pengaruh Perendaman Basis Akrilik Ortodonti Lepas dalam Infusa Daun Sirih (*Piper betle L.*) terhadap Jumlah Sel *Candida albicans* secara *in vitro*” akan digambarkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.10. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisa menggunakan program SPSS versi 17.0. Pertama kali akan dilakukan analisis deskriptif untuk memberikan gambaran dari karakteristik data yang didapatkan dari hasil penelitian.

Kemudian guna menentukan jenis uji statistik yang digunakan, perlu dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, karena

kelompok data berjumlah kecil ($n < 50$). Berikutnya dilakukan uji homogenitas dengan uji *Lavene's test*. Apabila data berdistribusi normal dan homogen, maka dapat digunakan uji statistik parametrik *One Way Anova*. Berikutnya adalah dilakukannya uji lanjutan, yaitu uji *Turkey HSD* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antar kelompok data yang diteliti.

Analisis data berikutnya ditujukan untuk melihat korelasi antara kedua variabel. Uji yang digunakan adalah uji korelasi *Pearson* karena data yang digunakan merupakan data interval. Analisis ini dilanjutkan dengan uji regresi sederhana untuk mendapatkan persamaan linier hasil penelitian.

