

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan *post control group design experimental laboratory design*.

4.2 Metode Pengukuran Jumlah *Candida albicans*

Pengukuran jumlah *Candida albicans* pada penelitian ini menggunakan metode *Plating Technique*. Metode ini merupakan metode perhitungan jumlah sel tampak (*visible*) dan di dasarkan pada asumsi bahwa bakteri hidup akan tumbuh, membelah dan memproduksi satu koloni tunggal. Satuan perhitungan yang dipakai adalah *CFU (Colony Forming Unit)* dengan cara membuat seri pengenceran sampel dan menumbuhkan sampel pada media padat. Pengukuran dilakukan pada plat dengan jumlah koloni berkisar 25-250 atau 30-300 menggunakan *colony counter* sebagai alat hitung.

4.3 Sampel**4.3.1 Kriteria Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kriteria sebagai berikut :

- a. Alat ortodonti lepasan yang dibuat oleh tekniker terdiri dari plat akrilik berukuran 10x10x1mm dan cengkram adam dari kawat *stainless steel* berdiameter 0,7mm
- b. Plat resin akrilik yang terbuat dari *self-cured acrylic*
- c. Plat resin akrilik dilakukan pemolesan

4.3.2 Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah sampel minimal dalam penelitian ini telah dihitung berdasarkan rumus Federer (2008) :

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

Keterangan :

t= jumlah perlakuan

n= jumlah ulangan

Dalam penelitian ini diketahui $t = 3$ yakni aquades steril sebagai kontrol, klorheksidin glukonat 2%, ekstrak Siwak 100%, maka perhitungan dapat dijabarkan sebagai berikut :

$$(3 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq 15/2$$

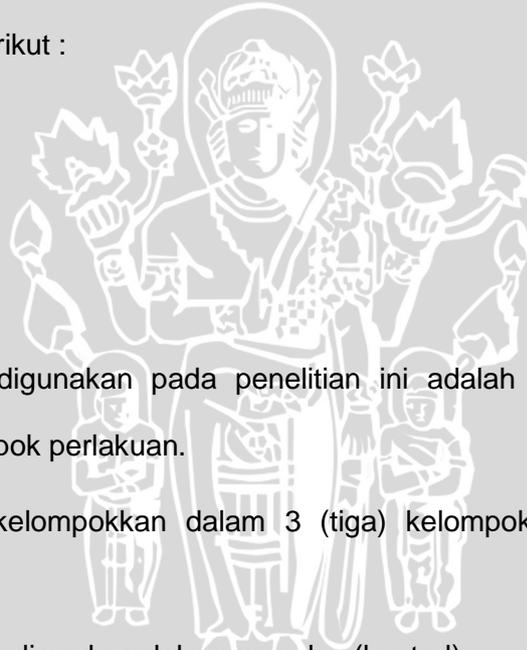
$$n \geq 7,5 + 1$$

$$n \geq 8,5 \rightarrow 9$$

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 sampel untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Sampel penelitian dikelompokkan dalam 3 (tiga) kelompok perlakuan, yaitu sebagai berikut :

- a. Kelompok I : direndam dalam aquades (kontrol)
- b. Kelompok II : direndam dalam larutan klorheksidin glukonat 2%
- c. Kelompok III : direndam dalam ekstrak Siwak 100%



4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Ekstrak batang kayu Siwak (*Salvadora persica*) dengan konsentrasi 100%, klorheksidin glukonat 2% dan aquades steril.

4.4.2 Variabel Terikat

Jumlah koloni *Candida albicans* pada alat ortodonti lepasan.

4.4.3 Variabel Terkendali

- a. Resin akrilik tipe *self-cured*
- b. Alat dan bahan yang digunakan melalui proses sterilisasi
- c. Kultur jamur *Candida albicans*
- d. Lama perendaman 60 menit

4.4.4 Variabel Tak Terkendali

Kekasaran permukaan plat resin akrilik

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan antara bulan Maret-April 2016.

- a. Pembuatan ekstrak Siwak (*Salvadora persica*) di Laboratorium Analisa Instrumental Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.
- b. Pengukuran jumlah *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat-alat

Alat ortodonti lepasan berupa plat akrilik (tidak dilakukan pemolesan pada permukaan yang menghadap palatum) dengan cengkram adam, cawan petri, tabung/wadah untuk merendam sampel, pinset dental, bunsen, ose, *mikropipet*, vortex, *colony counter*, inkubator, *autoclave*, *stopwatch*

4.6.2 Bahan

Ekstrak batang kayu Siwak (*Salvadora persica*) konsentrasi 100%, klorheksidin glukonat 2%, aquades steril, saliva buatan, media *sabouraud's dextrose agar*, suspensi *Candida albicans*

4.7 Definisi Operasional Variabel

4.7.1 Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*)

Bagian Siwak yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian batangnya yang berasal dari Negara Arab yang dibeli di salah satu toko di wilayah Kota Malang. Ekstrak dibuat dengan metode *maserasi* dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Konsentrasi ekstrak batang kayu Siwak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100%.

4.7.2 Klorheksidin

Larutan klorheksidin glukonat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sediaan cair yang tersedia di toko kedokteran gigi dengan konsentrasi 2%.

4.7.3 Alat Ortodonti Lepasan

Alat ortodonti lepasan pada penelitian ini dibuat oleh tekniker terdiri dari plat dasar yang berupa plat akrilik jenis *self-cured* berukuran 10x10x1mm dan komponen retentif yang berupa cengkram adam dari kawat *stainless steel* berdiameter 0,7mm.

4.7.4 Jumlah *Candida albicans*

Jamur *Candida albicans* yang digunakan dalam penelitian ini adalah salah satu macam isolat *Candida albicans* yang berasal dari *stock culture* bakteri yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang diperoleh dari hasil swab mukosa pasien yang terdiagnosis candidiasis. Isolat tersebut kemudian dibuat biakan cair dengan standar kepadatan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

4.7.5 Saliva Buatan

Komposisi larutan saliva buatan (buffer) McDougall (campuran 58,80g NaHCO_3 , 48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,42g KCl, 2,82g NaCl, 0,72g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24g CaCl_2 dalam 6 liter akuades) (Tanuwiria *et al.*, 2006).

4.7.6 Perendaman

Perendaman adalah suatu tindakan memasukkan alat ortodonti lepasan yang telah dilekati *Candida albicans* ke dalam ekstrak Siwak dan klorheksidin secara keseluruhan berdasarkan lamanya waktu yaitu 60 menit. Jangka waktu perendaman ini dihubungkan dengan lamanya alat ortodonti lepasan berada diluar mulut pasien.

4.8 Prosedur

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*)

4.8.1.1 Prosedur Persiapan Ekstraksi Siwak :

- 1) Siwak yang digunakan pada penelitian ini adalah batang kayu yang berasal dari Negara Arab dibeli dari salah satu toko di wilayah kota Malang sebanyak 1 kg.
- 2) Siwak dibersihkan dengan cara dicuci dengan air.
- 3) Siwak dipotong kecil-kecil, kemudian keringkan dengan dijemur sinar matahari sampai kering.
- 4) Siwak yang sudah kering dihaluskan untuk dibuat serbuk dengan derajat kehalusan tertentu menggunakan *electric blender*.

4.8.1.2 Prosedur Ekstraksi Siwak :

- 1) 600 g serbuk Siwak dimasukkan ke dalam wadah, setelah itu ditambahkan pelarut *etanol* 96% sebanyak 1000 ml.
- 2) Kemudian direndam selama 24 jam dengan melakukan pengadukan secara berkala
- 3) Setelah itu dilakukan penampungan *filtrat* (bagian cairan)
- 4) Ampas yang didapatkan dari penyaringan kemudian direndam kembali dengan menggunakan *etanol* 96% sebanyak 1000 ml lagi. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 5) Setelah filtrat dikumpulkan, selanjutnya dipekatkan dengan *Vacuum Rotary Evaporator* pada suhu 70-80°C (sesuai dengan titik didih pelarut) hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

4.8.2 Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

Candida albicans diambil menggunakan ose kemudian ditanam ke dalam *Sabouraud Dextrose Agar*, inkubasi selama 48 jam, dengan suhu 37°C. Kemudian membuat suspensi *Candida albicans* dengan cara mencampur *Candida albicans* dalam NaCl fisiologis 0,85 %, 20 ml, sehingga diperoleh kekeruhan suspensi *Candida albicans* 10^8 Mc Farland (10^8 CFU/ml). Suspensi ini yang dipakai sebagai kontaminasi pada alat ortodonti lepasan.

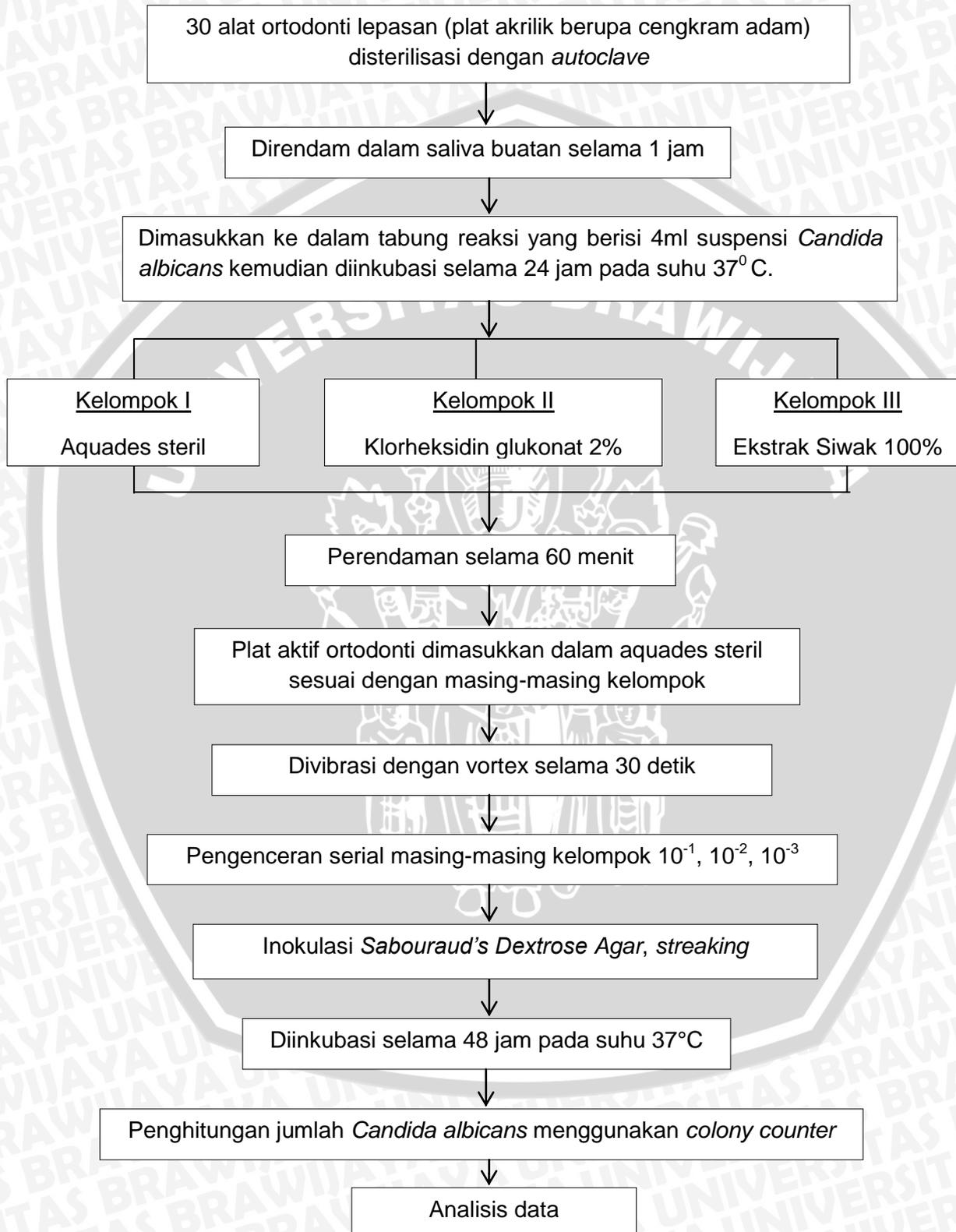
4.8.3 Uji Efektivitas Ekstrak Siwak dan Klorheksidin

- 1) Alat ortodonti lepasan dicuci di bawah air mengalir selama 48 jam untuk mengurangi sisa monomer kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* 121°C selama 18 menit.
- 2) Alat ortodonti lepasan direndam dalam saliva buatan selama 1 jam untuk memudahkan *Candida albicans* menempel pada alat ortodonti lepasan.
- 3) Selanjutnya alat ortodonti lepasan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 4ml suspensi *Candida albicans* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C agar jamur dapat berkembang.
- 4) Alat ortodonti lepasan setelah dikontaminasi dengan *Candida albicans* dimasukkan ke dalam tabung yang dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok I plat aktif ortodonti lepasan direndam dalam aquades sebagai kontrol, kelompok II direndam dalam klorheksidin 2%, kelompok III direndam dalam ekstrak Siwak 100%. Perendaman dilakukan selama 60 menit.

- 5) Masing-masing alat ortodonti lepasan dibilas dengan aquades.
- 6) Masing-masing alat ortodonti lepasan dimasukkan dalam aquades steril lalu divibrasi menggunakan vortex selama 30 detik untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada alat ortodonti lepasan.
- 7) Masing-masing tabung dilakukan pengenceran serial sampai mencapai suspensi *Candida albicans* 10^{-3} CFU/ml. 0,1ml hasil pengenceran serial ditetaskan diatas medium *Sabouraud's Dextrose Agar* pada cawan petri berdiameter 9cm masing-masing 10ml dengan menggunakan ose dilakukan *streaking* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.
- 8) Koloni yang terbentuk dihitung menggunakan *colony counter*.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.10 Analisis Data

Dalam penelitian ini, data yang didapatkan dianalisa dengan menggunakan *Shapiro Wilk* untuk menentukan data berdistribusi normal kemudian dilanjutkan dengan uji *Levene* untuk mengetahui data pada masing-masing kelompok sampel homogen. Apabila data berdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik menggunakan *Oneway ANOVA* untuk mengetahui pengaruh berbagai perlakuan pada perendaman plat aktif ortodonti lepasan terhadap jumlah *Candida albicans*. Uji statistik dilakukan dengan taraf kemaknaan 95% ($\alpha = 0.05$).

