

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment–post test only control group design*), yaitu desain penelitian yang melihat hasil dari kelompok uji dan kelompok kontrol setelah diberikan perlakuan tertentu, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perendaman lempeng akrilik *heat cured* dalam daun salam (*Syzygium polyanthum*) dan klorheksidin 0,2% terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Jumlah sampel penelitian berdasarkan rumus berikut :

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

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

Dalam penelitian ini akan diberikan perlakuan perendaman lempeng akrilik *heat cured* pada rebusan daun salam, klorheksidin 0,2%, dan NaCl 0,9% steril sebagai kontrol, sehingga $t = 3$. Berdasarkan rumus diatas, maka jumlah sampel (n) tiap kelompok dapat ditentukan sebagai berikut :

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

$$2(r-1) \geq 15$$

$$2r \geq 15+2$$

$$r \geq 17/2$$

$$r \geq 8,5$$

$$n = 9 \quad (\text{Mudiyanto ,2005})$$

Keterangan:

Jadi jumlah sampel (n) tiap kelompok adalah 9.

4.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini menggunakan berupa lempeng uji yang terbuat dari resin akrilik *heat cured* dengan ukuran (10x10x1)mm (Abbas, 2012).



Gambar 4.1 Lempeng akrilik ukuran 10x10x1 mm

4.2.3 Kriteria Sampel

A. Kriteria lempeng akrilik *heat cured*

Inklusi :

1. Bentuk ukuran sesuai dengan kriteria di atas (10x10x1 mm)
2. Sampel tidak porus
3. Permukaan sampel rata dan datar
4. Permukaan sampel di poles

Eksklusi :

1. Ketebalan lempeng tidak sama
2. Sampel retak dan pecah

B. Kriteria Daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Inklusi :

1. Daun salam yang usianya tua
2. Daun salam segar dan bersih

Eklusi :

1. Daun salam yang terkena bahan desinfektan
2. Daun salam yang sudah layu dan berwarna kecoklatan
3. Daun salam yang terkena hama

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Jenis Variabel	Variabel	Definsi Operasional	Alat Kerja	Hasil	Skala
Bebas	Perendaman resin akrilik yang dikontaminasi candida	Perendaman resin akrilik yang telah dikontaminasi candida didalam rebusan daun salam, klorheksidin 0,2% dan NaCl 0,9 %	Tabung reaksi, air rebusan daun salam, cairan kloheksidin 0,2 % dan cairan NaCl 0,9%	Hasil perendaman resin akrilik yang telah dikontaminasi candida didalam rebusan daun salam, klorheksidin 0,2%, NaCl 0,9%	Nominal
Terikat	Jumlah koloni Candida albicans	Hasil pengamatan kuantitatif yang didapat dari penghitungan jumlah koloni pada SDA dengan colony counter	Colony counter dan SDA	Resin akrilik <i>heat cured</i>	Interval
Terkendali	Resin akrilik <i>heat cured</i>	Resin akrilik tipe <i>heat cured</i> adalah resin akrilik yang polimerisasinya	Waterbath, Cuvet, Gips, Monomer, Polimer	Resin akrilik <i>heat cured</i> berupa lempeng	Rasio

		memerlukan pemanasan selama 90 menit pada suhu 70°C kemudian dilanjutkan selama 30 menit pada suhu 100°C, diperoleh dan dicetak pada Dental lab Malang.			
	Bentuk ukuran lempeng uji	Bentuk ukuran lempeng resin akrilik yang terstandarisasi	Model induk (Mold)	Lempeng resin akrilik dengan ukuran 10 x 10 x 1 mm	Rasio
	Pembuatan rebusan daun salam	Daun salam tua usia ± 2 minggu yang direbus dengan air selama 15 menit selama 90°C	Daun salam, magnetic stirrer hotplate, beaker glass	Air rebusan daun salam dengan konsentrasi yang ditentukan dengan penelitian pendahuluan sebanyak 100 ml	Rasio
	Jumlah klorheksidin 0,2% dan NaCl 0,9%	Jumlah klorheksidin 0,2% dan NaCl 0,9% per tabung reaksi 2 ml	Pipet, tabung reaksi, cairan klorheksidin dan NaCl	a. Klorheksidin 0,2 % 2 ml x 9 tabung reaksi = 18 ml b. NaCl 0,9% 2 ml x 9 tabung reaksi = 18 ml	Rasio

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian tugas akhir ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan November 2013 untuk menentukan konsentrasi rebusan daun salam (*Syzygium polyanthum*) dan penelitian selanjutnya dilaksanakan dari bulan Desember 2013 sampai Februari 2014.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Lempeng Uji

1. Alat

Master model dari stainless steel ukuran 10x10x1 mm, kuvet besar, pres hidrolik, *water bath*, vibrator, *lecron*, pisau malam, pisau model, pisau gips, pot porselen, mikromotor, *straight handpiece*, spuit, bur fraser dan stone, mesin poles, *cone* dan *brush*.

2. Bahan

Gips tipe 3, resin akrilik *heat cured*, bubuk *pumice* dan *kryte*, *cold mould seal*, plastic selopan, vaselin.

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Rebusan Daun salam

1. Alat

Beaker glass 200 ml, blender, *magnetic stirrer hotplate*, timbangan digital, *water bath*, sterilisator/hot oven.

2. Bahan

Serbuk daun salam, *aquades*, kertas saring.

4.5.3 Alat dan Bahan Perendaman Lempeng Uji

1. Alat

Pipet ukur 1 ml, pipet filler, tabung reaksi, rak tabung, cawan petri, pinset, *vortex*, *autoclave*, sentrifus, *freezer*.

2. Bahan

Rebusan daun salam, klorheksidin 0,2%, NaCl 0,9%, *aquades*, saliva steril, *phosphate buffered saline*, *sabouraud's broth*, *sabouraud's dextrose agar* (SDA), *Candida albicans*.

4.5.4 Alat dan Bahan Identifikasi dan Penghitungan Koloni *Candida albicans*

1. Alat

Objek glass, kapas, Bunsen, mikroskop, inkubator, *colony counter*.

2. Bahan

Aquades steril, isolat jamur *Candida albicans*, kristal violet, lugol, alkohol

96%, saponin, serum mamalia.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Lempeng Uji

- a. Mempersiapkan kuvet besar untuk pembuatan lempeng uji.
- b. Mempersiapkan model induk terbuat dari *stainless steel* berbentuk persegi panjang dengan ukuran 10 x10 x 1 mm.
- c. Membuat adonan gips keras yang terdiri dari *aquades* 15 ml dan bubuk gips tipe 3 50 gr dalam mangkuk karet.
- d. Seluruh bagian dalam kuvet diolesi dengan vaselin. Adonan dimasukan ke dalam kuvet yang telah disiapkan diatas vibrator.
- e. Model induk diletakkan pada adonan dalam kuvet bawah.
- f. Diamkan sampai gips mengeras selama 60 menit.
- g. Permukaan gips diolesi vaselin dan kuvet atas diisi dengan adonan gips
- h. Setelah gips mengeras, kuvet dibuka, model induk diangkat, *Mould* yang didapat dituangi air panas sampai bersih untuk membuang vaselin yang tersisa
- i. Setelah kering diolesi dengan separator, tunggu selama 20 menit (sesuai dengan petunjuk pabrik).

4.6.1.1 Pengisian Resin Akrilik pada *Mould*

- a. Monomer dituang ke dalam pot porselen dan masukan monomer dengan perbandingan 3 gram polimer : 1 ml monomer. Adonan diaduk dengan semen spatula sampai monomer dan polimer tercampur dan homogen sampai adonan tidak lengket yaitu *dough stage* dan tidak menempel pada dinding pot porselen.
- b. *Mould* diisi dengan adonan resin akrilik (*dough stage*)
- c. Letakkan plastik tipis/cellophane diantara kuvet atas dan bawah, dan *press* perlahan dengan *hydraulic press* dengan tekanan 1000 psi. Kuvet dibuka kembali dan akrilik yang berlebih di potong dengan *lecron*. Kemudian kuvet ditutup, dilakukan *press* kembali secara perlahan-lahan. Buka kuvet atas, plastik dilepas dan akrilik yang berlebih dipotong kembali menggunakan *lecron*. Kuvet atas ditutup kembali lalu dilakukan penekanan akhir sampai 2000 psi sampai kuvet atas dan bawah rapat dan dibiarkan 15 menit (Craig *et al*, 2006).

4.6.1.2 *Curing*

Kuvet dimasukan ke dalam *water bath*, mula-mula suhu dan waktu *curing* diatur yakni 70°C dibiarkan selama 30 menit, kemudian suhu dan waktu *curing* dinaikkan menjadi 100°C dibiarkan selama 90 menit, setelah itu kuvet dibiarkan dingin (Dhun, 2008).

4.6.1.3 Penghalusan dan Pemolesan

Lempeng uji dikeluarkan dari kuvet, kemudian dirapikan dan menghilangkan bagian yang tajam dengan menggunakan bur Fraser. Permukaan poles dan cetak dipoles menggunakan mata bur stone

berwarna hijau dan merah muda. Kemudian permukaan poles, dipoles dengan *brush* dan *pumice* serta *cone* dan *kryte*.

4.6.2 Pembuatan Rebusan Daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Daun salam segar sebanyak 100 gram yang telah dicuci bersih, dikeringkan, dipotong-potong, dibelender, kemudian ditambah dengan *aquades* dengan suhu 90°C (panas) sebanyak 100 ml, direbus dalam wadah *beaker* gelas menggunakan *magnetic Stirrer Hotplate* selama 15 menit, lalu disaring dengan kertas saring (BPOM RI, 2010). Daun salam direbus untuk mengeluarkan zat aktif yang terkandung dalam daun salam tanpa harus memakai prosedur rumit, agar pasien pemakai gigi tiruan dapat mengaplikasikan dengan mudah.

4.6.3 Persiapan Koloni *Candida albicans*

4.6.3.1 Identifikasi *Candida albicans*

A. Pemeriksaan Mikroskopis

1. Pembuatan Slide

Membersihkan gelas objek dengan kapas, kemudian dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak, dibiarkan dingin. Dibuat sedemikian rupa, sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:

- Satu ose *aquades* steril ditetaskan pada gelas objek. Kemudian biakkan jamur diambil sedikit menggunakan ose, selanjutnya kuman disuspensikan dengan *aquades* pada gelas objek dan diratakan.
- Sediaan kering dibiarkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan diatas api.

2. Pewarnaan Gram

- a. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- b. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- c. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol segera dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Sediaan ditetesi dengan saponin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian saponin dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 1000x.

B. Germinating Tube Test

- a. Isolat jamur diambil dari pembenihan yang sama dengan yang digunakan untuk test pewarnaan gram. Diambil dengan ose yang sudah disterilisasi, kemudian dimasukkan serum mamalia 0,5 ml
- b. Sediaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5-2 jam
- c. Kultur dalam serum diambil dengan ose dan diletakkan pada gelas objek
- d. Sediaan ditutup menggunakan kaca penutup
- e. Sediaan diamati dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 400x

4.6.4 Persiapan Lempeng Uji

- a. Lempeng uji yang dijadikan sebagai sampel direndam dalam *aquades* selama 2 x 24 jam. Menurut Combe (1992), resin akrilik menyerap suatu

cairan sampai jenuh setelah 2 x 24 jam, sehingga keadaan tersebut dapat diasumsikan sama dengan kondisi gigi tiruan dalam rongga mulut.

- b. Lempeng uji disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 18 menit (Combe, 1992)
- c. Lempeng uji dimasukkan ke dalam saliva steril selama 1 jam pada suhu 37°C guna pembentukan pelikel (Evans et al, 1977)
- d. Lempeng uji diambil dan dibilas dengan larutan *Phosphatase Buffered Saline* sebanyak dua kali untuk membersihkan dari kotoran yang ikut menempel.

4.6.4.1 Kontaminasi Lempeng Uji dengan *Candida albicans*

Lempeng uji dikontaminasi dengan cara dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi suspense *Candida albicans*. Pembuatan suspense *Candida albicans* dilakukan dengan mengambil 1-2 ose biakan murni *Candida albicans* yang telah dikultur kemudian dicampurkan dengan larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar Mac Farland atau sebanding dengan jumlah bakteri 1×10^8 CFU/ml.

4.6.5 Perendaman Lempeng Uji

- a. Tiap satu lempeng uji dimasukkan ke dalam satu tabung reaksi kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk menumbuhkan koloni *Candida albicans*, sehingga *Candida albicans* dapat melekat pada lempeng uji (Evans et al, 1997). setelah 24 jam, lempeng uji dikeluarkan dari tabung reaksi. Tiap satu lempeng uji dimasukkan dan direndam didalam satu tabung reaksi pada masing-masing kelompok yaitu kelompok tabung reaksi

- daun salam (*Syzygium polyanthum*), klorheksidin 0,2%, dan NaCl 0,9% sebagai kontrol sebanyak 2ml.
- b. Lempeng uji dikeluarkan dari tabung reaksi dan dibilas dengan *Phosphatase Buffered Saline* sebanyak dua kali.
 - c. Lempeng dimasukkan kedalam tabung reaksi 10ml. Sabouraud's Broth, kemudian digetarkan dengan menggunakan alat getar vortex selama 30 detik untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada lempeng uji.
 - d. Selanjutnya 1 ose (0,001 ml) cairan Sabouraud's Broth dibenihkan pada *Sabouraud's Dextrose Agar* (SDA), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.6.5 Penghitungan Jumlah Koloni *Candida albicans*

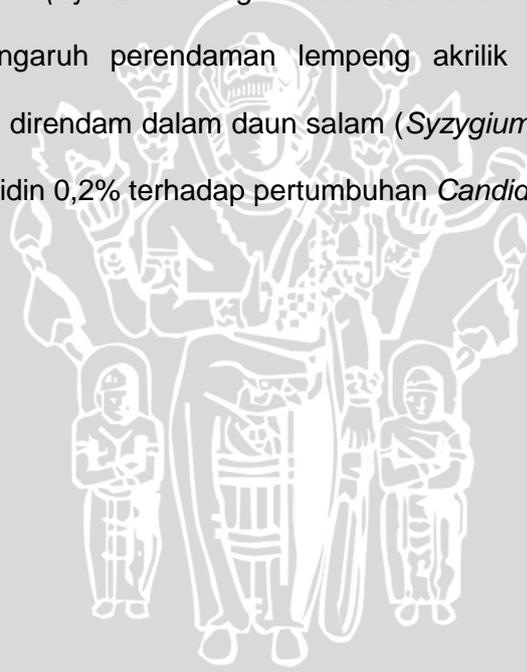
Jumlah koloni *Candida albicans* di hitung menggunakan alat *colony counter* dengan satuan CFU/ml dalam 100 ml. Penghitungan dilakukan setelah inkubasi 24 jam.

4.6.6 Analisis Data

Hasil perhitungan pertumbuhan *Candida albicans* dihitung dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkahnya sebagai berikut:

1. Uji normalitas data yang bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, jika sebaran data normal maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
2. Uji homogenitas varian yang bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi *Anova*, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji *Anova*.

3. Uji *Oneway Anova*, untuk melihat pengaruh perendaman lempeng akrilik *heat cured* terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok yang direndam dalam daun salam (*Syzygium polyanthum*), klorheksidin 0,2%, dan larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol.
4. Dilakukan uji *Kruskal Wallis* jika hasil tes uji homogenitas varian menunjukkan data tidak terdistribusi homogen dan varian tidak sama ($p < 0,05$).
5. *Post Hoc Test (Uji Least Significants Differences)*, untuk melihat perbedaan pengaruh perendaman lempeng akrilik *heat cured* pada kelompok yang direndam dalam daun salam (*Syzygium polyanthum*), dan dalam klorheksidin 0,2% terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.



4.6.8 Alur Penelitian

