

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan *post test only control group design* dan dilakukan secara *in vitro* dengan metode dilusi agar untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dari ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan konsentrasi yang berbeda-beda terhadap bakteri *mix* saluran akar gigi sulung dengan diagnosis nekrosis pulpa.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *mix* saluran akar yang diambil dari pasien anak di departemen IKGA RSP UB dengan kriteria inklusi :

- Subyek penelitian adalah pasien anak dengan rentang usia 5-12 tahun.
- Pasien memiliki gigi nekrosis pada gigi sulung anterior rahang atas.
- Pasien tidak merasakan adanya nyeri spontan.
- Berdasarkan foto periapikal pasien tidak memiliki abses pada gigi yang nekrosis, akar gigi nekrosis masih utuh dan tidak ada resorpsi akar.

Sedangkan kriteria eksklusi subyek penelitian :

- Pasien anak tidak dalam rentang usia 5-12 tahun.
- Pasien tidak memiliki gigi nekrosis pada gigi sulung anterior rahang atas.
- Pasien masih merasakan adanya nyeri spontan.
- Berdasarkan foto periapikal pasien sudah memiliki abses pada gigi yang nekrosis, akar gigi nekrosis tidak utuh dan ada resorpsi akar.

4.2.2. Besar Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri, sehingga penentuan besar sampel ditetapkan sesuai dengan penetapan baku uji bakteri yaitu 10^8 bakteri. Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Rancangan Acak Lengkap (RAL): $t(r-1) \geq 15$; dengan t merupakan jumlah kelompok ($t = 6$) dengan 5 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol bakteri dan r merupakan jumlah pengulangan/sampel (Federer, 2008) :

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

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3,5$$

Jumlah pengulangan yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 4 kali.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan lima konsentrasi pada masing-masing ekstrak dan kontrol bakteri. Konsentrasi ekstrak ditentukan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan (lihat Lampiran 2).

4.3.2. Variabel Terikat

Nilai KHM (Kadar Hambat Minimal) dari bakteri *mix* saluran akar gigi sulung yang nekrosis.

4.3.3. Variabel Terkendali

Suhu dan waktu inkubasi.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak RSP Universitas Brawijaya.

4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Februari 2016.

4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian meliputi ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah, etanol 96%, aquades steril, bakteri *mix* saluran akar gigi sulung yang nekrosis, *paper point*, *Thioglycolate*, *Blood Agar*, NA, larutan NaCl 0,85% steril, *cotton roll*.

4.5.2. Alat/Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian meliputi *elenmeyer*, *autoclave*, *incubator*, cawan petri, *anaerobic jar dan kit*, *colony counter*, tabung reaksi, vortex, syringe, pinset, spektrofotometer, spatula, mikropipet, evaporator, pelubang, jangka sorong, ose, gelas objek, pembakar spirtus, mikroskop pembesaran objektif 1000x, alat-alat pemeriksaan gigi dan mulut yaitu kaca mulut, pinset, sonde half moon, escavator.

4.1. Definisi Istilah/Operasional

No	Variabel Bebas	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Pengukuran	Skala Data	Hasil Pengukuran
1.	Daun sirih hijau dan daun sirih merah	Daun sirih hijau dan daun sirih merah yang digunakan adalah daun sirih yang sudah tua yang didapat dari BMM (Balai Material Medika) Malang dalam sediaan serbuk atau simplisia	Neraca	Dengan dilakukan penimbangan	Rasio	Dalam satuan gram
2.	Ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah	Ekstrak yang didapatkan atau dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%	Gelas ukur	Dengan pengukuran volume	Rasio	Dalam satuan ml
3.	Konsentrasi ekstrak daun	Konsentrasi ekstrak daun sirih hijau dan daun sirih merah	Mikropipet	Perbandingan antara ekstrak daun	Rasio	Dalam satuan persen (%)

2.	KHM (Kadar Hambat Minimal)	<p>dimasukkan ke dalam saluran akar gigi yang dilakukan di Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak RSP UB</p> <p>Efektivitas penghambatan pertumbuhan bakteri <i>mix</i> saluran akar gigi sulung yang nekrosis dari ekstrak daun sirih hijau dan ekstrak daun sirih merah direpresentasikan dengan nilai KHM</p>	Colony counter atau dengan skor	Penghitungan jumlah koloni bakteri atau dengan skor subjektif	Colony Counter = rasio Skor = kategorik	Skor : 0 = Tidak ada pertumbuhan bakteri +1 = Terdapat pertumbuhan koloni tipis, tepi tidak menebal +2 = Terdapat pertumbuhan koloni tipis, tepi mulai menebal
----	----------------------------	--	---------------------------------	---	---	---



									+3 = Terdapat pertumbuhan koloni menebal, tepi tebal Colony Counter : Dalam satuan CFU
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



No	Variabel Terkendali	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Pengukuran	Skala Data	Hasil Pengukuran
1.	Suhu dan waktu inkubasi	Suhu dan waktu yang digunakan untuk inkubasi selama penelitian	Inkubator dan waktu	Dengan pengaturan suhu pada inkubator dan melihat hasil penelitian pada waktu yang sama	Rasio	Suhu : 37°C Waktu : 18-24 jam

4.6. Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau dan Daun Sirih Merah

Daun sirih hijau dan daun sirih merah segar yang telah dipetik sebanyak 800 gram dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air sampai bersih dan ditiriskan. Selanjutnya, daun sirih dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40-50^o C. Daun sirih yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan dan ditimbang menggunakan timbangan simplisia sebanyak 150 gram. Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam daun sirih ke dalam bejana maserasi secara terpisah kemudian diberi larutan etanol 96% sebanyak 200 ml. Masukkan bahan yang telah dibasahi dengan pelarut kedalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai daun terendam sempurna, total yang digunakan sebanyak 250 ml. Toples tersebut ditutup rapat dan didiamkan selama 24 jam sambil diaduk atau di *shaker* satu kali setiap hari. Saring ekstrak dengan penyaring kain dan tampung ekstrak dalam elenmeyer. Lakukan remaserasi pada ampas dengan cara dimasukkan kembali dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam. Kemudian biarkan selama 24 jam dan dishaker. Remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 250 ml. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak cair yang dihasilkan dievaporasi atau diuapkan di atas *water bath* selama 1 jam (Sendy dkk., 2014).

4.7.2. Kultur Bakteri *Mix Saluran Akar*

- a. Pemeriksaan pasien anak yang memiliki gigi sulung anterior dengan diagnosis nekrosis pulpa.

- b. Pengambilan spesimen bakteri saluran akar pada gigi sulung anterior yang mengalami nekrosis pulpa untuk tiap sampelnya. Pengambilan spesimen bakteri dilakukan sebelum dilakukan perawatan saluran akar.
- c. *Paper point* steril no.25 dimasukkan ke saluran akar gigi tersebut selama 60 detik untuk pengambilan spesimen bakteri *mix* saluran akar.
- d. *Paper point* yang berisi bakteri *mix* saluran akar gigi nekrosis dimasukkan ke dalam *Thioglycolate*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.7.3. Identifikasi Bakteri *Mix* Saluran Akar yang Dominan dengan Pewarnaan Gram

- a. Dibuat sediaan (*slide*) pada gelas objek, dikeringkan kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan di atas api bunsen.
- b. Kristal violet diteteskan di atas sediaan dan dibiarkan selama 1 menit
- c. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas air.
- d. Lugol diteteskan di atas sediaan dan dibiarkan selama 1 menit.
- e. Sisa lugol dibuang dan dibilas air.
- f. Alkohol 96% diteteskan di atas sediaan selama 5-10 detik.
- g. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- h. Safarin diteteskan di atas sediaan selama 30 detik.
- i. Sisa safarin dibuang dan dibilas dengan air.
- j. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x, sehingga pembesaran total yang digunakan adalah 1000x.
- k. Hasil : Gram positif tercatat ungu sedangkan Gram negatif tercatat merah.

4.7.4. Pembuatan Suspensi Bakteri *Mix* Saluran Akar

- a. Setelah inkubasi bakteri *mix* saluran akar 18-24 jam pada suhu 37^o C, suspensi bakteri *mix* saluran akar gigi nekrosis dalam tabung reaksi dikocok dengan menggunakan *vortex*.
- b. Kemudian kekeruhan yang terjadi dilakukan pengukuran absorbansi larutan standar *McFarland* 0,5, diukur *Optical Density* (OD) = 0,1 dengan spektrofotometer pada 625 nm. Berdasarkan pengukuran, nilai absorbansi larutan standar *McFarland* 0,5 setara dengan jumlah bakteri 1,5x10⁸ CFU/ml (Tortora *et al.*, 2007).
- c. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi bakteri yang mengandung 1x10⁶ CFU/ml dengan dilakukan pengenceran dengan rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ (Tortora *et al.*, 2007).

4.7.5. Pengujian Antibakteri Metode Dilusi Agar

4.7.5.1. Pembuatan Agar yang Mengandung Ekstrak Daun Sirih Hijau dan Ekstrak Daun Sirih Merah

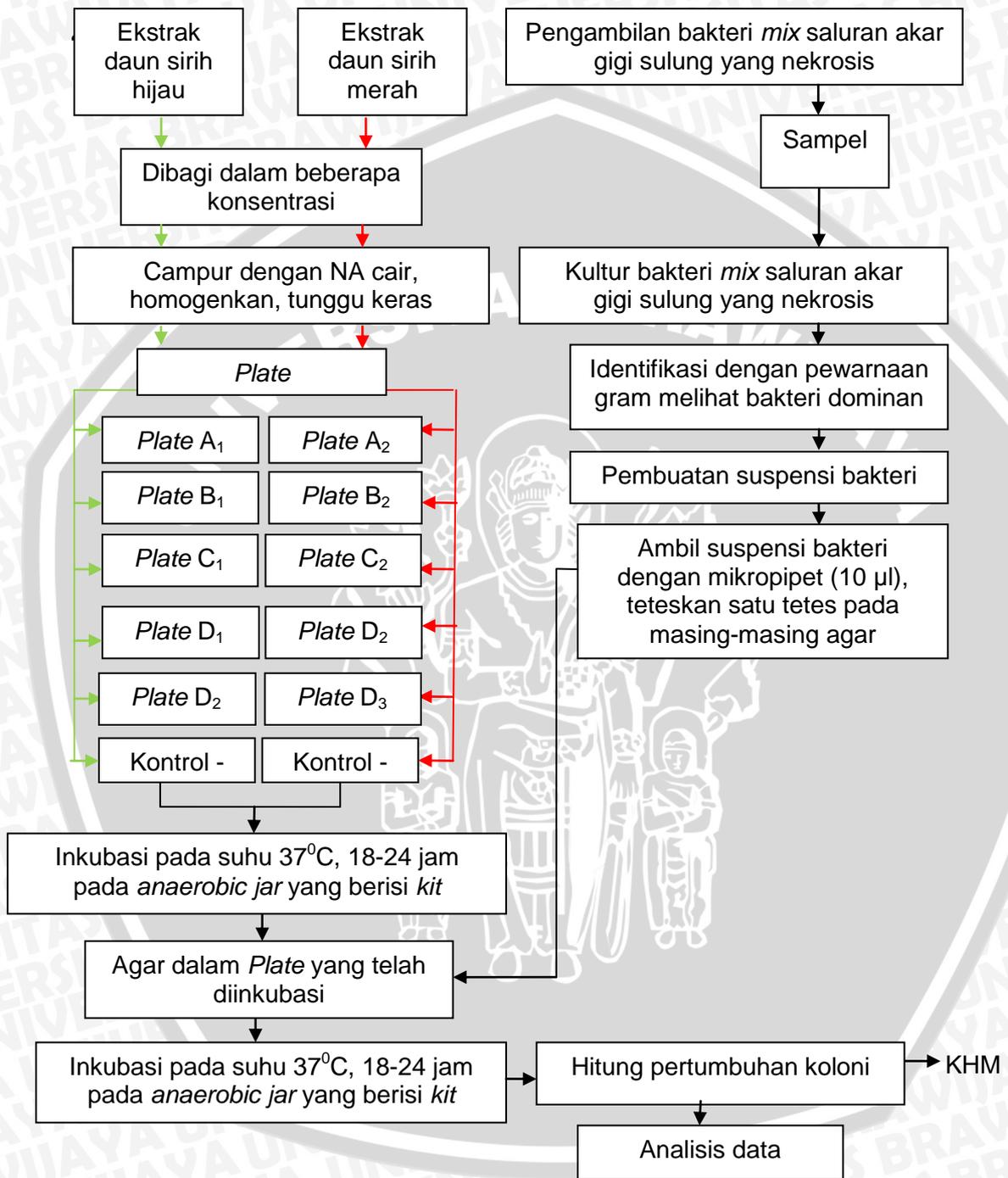
- a. Menyiapkan 6 *plate* berdiameter 9 cm untuk ekstrak daun sirih hijau dan 6 *plate* untuk ekstrak daun sirih merah untuk beberapa konsentrasi yang telah diberi tanda dan sebelumnya telah disterilkan
- b. Masing-masing *plate* diisi dengan dengan masing-masing konsentrasi yang telah ditentukan kemudian dicampur dengan NA cair dan di homogenkan. Volume total yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml.
- c. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10⁶ CFU/ml.

- d. Masing-masing *plate* yang berisi NA dan ekstrak daun sirih hijau serta ekstrak daun sirih merah dalam beberapa konsentrasi kemudian dibiarkan mengeras dan dilakukan inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

4.7.5.2. Pengujian Antibakteri dengan Metode Dilusi Agar

- a. Setiap *Plate* yang berisi NA dan ekstrak daun sirih hijau serta ekstrak daun sirih merah dalam beberapa konsentrasi yang telah mengeras keesokan harinya dibagi menjadi 4 kuadran untuk ditetesi bakteri serta pengulangan sebanyak 4 kali.
- b. Bakteri ditetaskan di atas agar sebanyak satu tetes dengan menggunakan mikropipet. Volume 1 tetes mikropipet setara dengan 10 µl suspensi bakteri yang mengandung 10⁴CFU/10 µl dalam setiap media NA.
- c. Kemudian dilakukan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- d. Keesokan harinya, dilakukan pengamatan koloni bakteri yang tumbuh pada media NA. Konsentrasi ekstrak daun sirih hijau dan ekstrak daun sirih merah terendah pada media NA yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni maka dapat disebut KHM.
- e. Pada *plate* yang masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri, dilihat tingkat pertumbuhan dengan cara menghitung koloni dengan *colony counter*. Apabila jumlah koloni tidak dapat dihitung maka derajat pertumbuhan koloni dapat ditentukan dengan pemberian skor sebagai berikut :
 - 0 = Tidak ada pertumbuhan bakteri
 - +1 = Terdapat pertumbuhan koloni tipis, tepi tidak menebal
 - +2 = Terdapat pertumbuhan koloni tipis, tepi mulai menebal
 - +3 = Terdapat pertumbuhan koloni menebal, tepi tebal
- f. Data yang didapat kemudian dianalisis.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian Perbedaan Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Bakteri *Mix* Saluran Akar Gigi Sulung dengan Diagnosis Nekrosis Pulpa secara *In Vitro*



4.9. Analisis Data

4.9.1. Metode Analisis Data

Hasil pengamatan tersebut kemudian dilakukan uji analisis statistik menggunakan uji normalitas dan homogenitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan *Levene Test* dengan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha=0,05$). Jika sebaran data normal serta varian data homogen ($\alpha>0,05$), maka digunakan uji *One Way ANOVA*. Jika sebaran data tidak normal dan tidak homogen ($\alpha<0,05$) maka digunakan analisis statistik non parametrik, menggunakan uji beda *Kruskall Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji Korelasi dan Regresi. Dan yang terakhir dilakukan uji *t-test* (Dahlan, 2009).

