

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni laboratorium (*in vitro*) menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang diujikan pada populasi *Candida albicans* yang terdapat pada plat resin akrilik ortodontik lepasan.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Bahan uji yang akan digunakan adalah ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) di peroleh dari daerah Yogyakarta dan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) diolah di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

2. Mikroba Uji

Mikroba yang akan dijadikan sebagai subjek penelitian diisolasi dari populasi mikroba yang ada pada pengguna ortodontik lepasan, khususnya *Candida albicans* diperoleh dengan cara swab yang diusap pada akrilik yang berhubungan langsung dengan palatum.

3. Besar Sampel

Jumlah ulangan dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1967). Kelompok perlakuan ada 6 yaitu ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 100%, kelompok kontrol negatif dengan aquades dan kelompok kontrol positif dengan *Chlorhexidine* 0,2 %. Rumus Federer (Federer, 1967) yang digunakan adalah

$$(n-1)(t-1) \geq 15, \text{ dimana}$$

n = Jumlah ulangan tiap perlakuan

t = Jumlah kelompok perlakuan

diketahui $t = 6$

ditanya $n = ?$

$$\text{Jawab} \quad = (n-1)(t-1) \geq 15$$

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

$$(n-1)5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n = 15 + 5$$

$$5n = 20$$

$$n = 4$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas, maka jumlah pengulangan minimal pada tiap kelompok perlakuan adalah 4 kali pengulangan. Kelompok perlakuan yang berjumlah 6 kelompok tersebut

dibagi menjadi 2 cawan petri yang masing masing cawan petri berisi 3 lubang sumuran.

4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Berjenis kelamin perempuan dengan kisaran usia 18-24 tahun
2. Pasien bersedia menjadi subjek penelitian
3. Telah mengisi *informed consent*
4. Tidak sedang mengkonsumsi antibiotik
5. Pasien pengguna ortodontik lepasan

b. Kriteria Eksklusi

1. Pasien pengguna obat kumur
2. Merokok

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pembuatan *Candida albicans* pada ortodontik lepasan dan pengujiannya terhadap ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), sedangkan proses ekstraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPTT) Universitas Gajah Mada. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 hingga Februari 2017.

D. Variable Penelitian

a. Variabel pengaruh:

Ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100%.

b. Variabel terpengaruh:

Jamur *Candida albicans* yang di kultur dari plat ortodontik lepasan

c. Variabel terkendali:

1. Konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) 12,5%, 25%, 50%, 100%
2. Lamanya inkubasi
3. Media agar
4. Sterilisasi alat
5. Suhu inkubasi

d. Variabel tak terkendali:

1. Kontaminasi organisme lain seperti jamur dan bakteri lain seperti *Bacillus*

E. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh merupakan hasil dari bahan mentah secara kimiawi yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari daun belimbing wuluh menggunakan pelarut etanol 70%.

- b. *Candida albicans* adalah jenis fungi yang umumnya berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus dan licin. Warnanya putih kekuningan dan berbau asam seperti aroma tape.
- c. Kadar hambat adalah kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba.
- d. Ortodontik lepasan adalah alat yang dapat dilepas dan dipasang sendiri oleh penggunanya, terdiri dari plat dasar yang terbuat dari akrilik yang digunakan sebagai rangka.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Alat untuk ekstrak
- b. Waterbath sebagai tempat hasil saringan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)
- c. Kertas saring untuk menyaring daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi .L*) yang telah dimaserasi
- d. Tabung reaksi untuk tempak ekstrak belimbing wuluh dan larutan jamur
- e. Rak tabung
- f. Kapas lidi steril
- g. Ose untuk menggores atau mengambil jamur
- h. Lampu spiritus untuk sterilisasi alat
- i. Cawan petri untuk tempat pembiakan *Candida albicans*
- j. Pipet dan Mikropipet untuk pengambilan larutan jamur

- k. Pipet volume untuk pengambilan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi .L*)
 - l. Inkubator
 - m. *Slidding caliper* dengan ketelitian 0,05 mm
 - n. Oven
 - o. Spiritus
 - p. Alat tulis digunakan untuk mencatat hasil penelitian
 - q. Masker
 - r. *Gloves*
2. Bahan Penelitian
- a. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100%.
 - b. Biakkan *Candida albicans*
 - c. Akuades steril untuk pengenceran ekstrak etanolik daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi .L*)
 - d. Handscoon dan masker
 - e. SDA (*Saboraud Dextrose Agar*)
 - f. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
 - g. Populasi mikroba
 - h. Kertas label
 - i. Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak
 - j. NaCL 0,9%
 - k. *Chlorhexidine 0,2%*

G. Jalannya Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan subjek penelitian

- 1) Mengurus surat ijin penelitian
- 2) Memilih subjek pemakai ortodontik lepasan sesuai kriteria
- 3) Menyiapkan *informed consent*

b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan untuk uji bakteri yang terbuat dari kaca disterilkan dengan oven pada suhu 180°C – 200°C selama 1 jam, sedangkan untuk media agar darah di sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 200°C selama 5 menit.

2. Tahap Pelaksanaan Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) segar yang telah dicuci bersih dipotong-potong tipis kemudian dikeringkan. Setelah kering daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) tersebut ditumbuk dan diayak halus. Serbuk halus dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) tersebut di maserasi dengan etanol 70%, kemudian disaring. Hasil saringan yang berupa cairan diuapkan ke atas *waterbath*. Penguapan dilakukan sampai semua etanol menguap. Ekstrak etanolik daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang akan digunakan dalam penelitian ini disiapkan dengan menimbang sejumlah ekstrak kental kemudian

dilarutkan dalam akuades steril sebagai larutan stok. Konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100% diperoleh dengan cara pengenceran akuades steril dengan perhitungan sebagai berikut.

$$M_1 : V_1 = M_2 : V_2$$

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi awal ekstrak daun belimbing wuluh (%)

V_1 : Volume awal ekstrak daun belimbing wuluh (ml)

M_2 : Konsentrasi akhir ekstrak daun belimbing wuluh (%)

V_2 : Volume akhir ekstrak daun belimbing wuluh (ml)

(Kartikasari *et al.*, 2012)

3. Pengisolasian Bakteri

a. Pengambilan dan Kultur Bakteri

Populasi candida diperoleh dengan cara swab yang sebelumnya dibasahi terlebih dahulu menggunakan NaCL steril lalu subyek melepas alat ortodontik lepasan, swab steril diusap pada akrilik yang berhubungan dengan palatum. Oleskan pada subouround dektosa agar pada cawan petri untuk media pertumbuhan *Candida albicans* lalu di inkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C, terjadi pertumbuhan koloni candida.

b. Persiapan Bakteri Uji

Satu koloni jamur diambil dari hasil isolat yang telah diinkubasi selama 48 jam diambil dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi NaCL 1-2 ml kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam, setelah diinkubasi selama 2-4 jam larutan candida akan dibuat suspensi sesuai standar Brown III yaitu diencerkan dengan media BHI (*Brain Heart Fusion*) kemudian digojok hingga kekeruhan 10^6 CFU/ml.

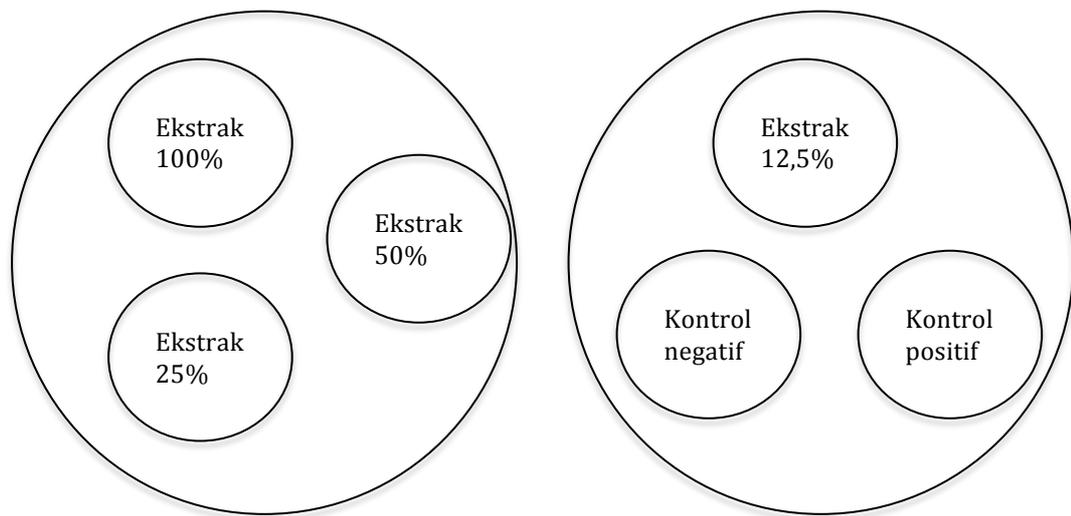
4. Uji Kepekaan Bakteri

a. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

Setelah mendapatkan standar konsentrasi candida, candida diambil dengan menggunakan kapas lidi steril dan dioleskan pada permukaan media SDA secara merata, selanjutnya karena kelompok perlakuan ada 6 buah yakni kelompok perlakuan 12,5%, 25%, 50%, 100%, aquades dan *chlorhexidine*, maka dibagi menjadi 2 cawan petri yang masing masing berisi 3 buah, sumuran dibuat lubang sumuran sebanyak 3 lubang pada masing masing cawan petri dengan masing masing lubang berdiameter 5 mm dan kedalam 3mm. Seluruh lubang pertama diisi konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) 100%, pemindahan bakteri dari satu tempat ketempat lain harus dilakukan didekat spiritus agar meminimalkan terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme lain.

Kelompok perlakuan pertama membutuhkan 2 cawan petri, sedangkan pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali, sehingga total

cawan petri yang digunakan adalah 8 cawan petri. Pembagian lubang sumuran dalam cawan petri seperti pada gambar berikut :



Gambar 3. Sumuran cawan petri

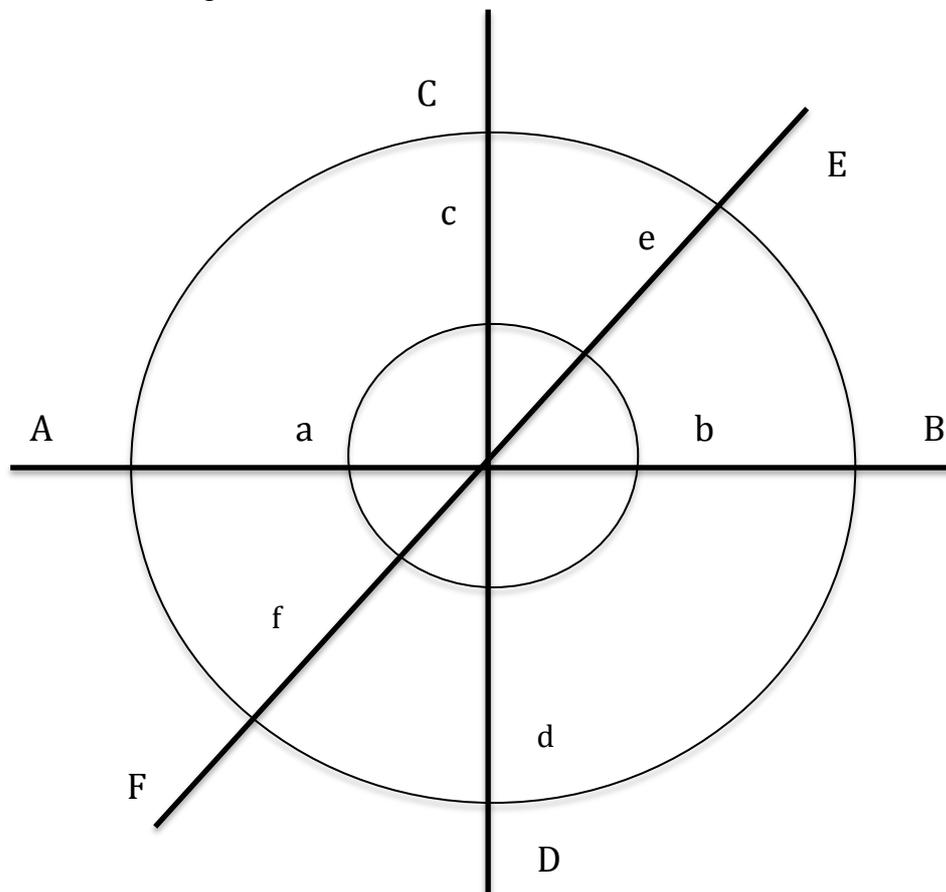
Langkah uji candida diatas dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali, dengan 3 sumuran setiap 1 cawan petri, setelah semua cawan petri media pertumbuhan bakteri sudah ditetesi ekstrak masing-masing 12,5%, 25%, 50%, 100%, aquades dan *chlorhexidine* 0,2%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

b. Pengukuran Zona Radikal

Pengukuran zona radikal menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm. setiap sumuran dalam cawan petri dilakukan pengulangan pengukuran diameter sumuran sebanyak tiga kali guna mendapatkan hasil pengukuran yang reliable.

Cara pengukuran zona radikal yaitu dengan menarik 3 garis melewati titik pusat lubang sumuran. Pada pengukuran pertama menggunakan

diameter daerah hambat (A-B) dikurangi diameter lubang sumuran (a-b) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran kedua menggunakan diameter hamat (C-D) dikurangi diameter lubang sumuran (c-d) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran ketiga menggunakan diameter hamat (E-F) dikurangi diameter lubang sumuran (e-f) kemudian hasilnya dibagi 2. Data pengukuran pertama, kedua dan ketiga diambil nilai rata-ratanya, maka akan diperoleh data zona radikal.



Gambar 4. Pengukuran zona radikal

Keterangan gambar 5 :

A,B,C,D,E,F : Titik terluar zona radikal

a,b,c,d,e,f : titik dalam zona radikal

$$\text{Pengukuran pertama} = \frac{(AB-ab)}{2} \quad (1)$$

$$\text{Pengukuran kedua} = \frac{(CD-cd)}{2} \quad (2)$$

$$\text{Pengukuran ketiga} = \frac{(EF-ef)}{2} \quad (3)$$

$$\text{Zona radikal} = \frac{(\text{pengukuran (1)+(2)+(3)})}{3}$$

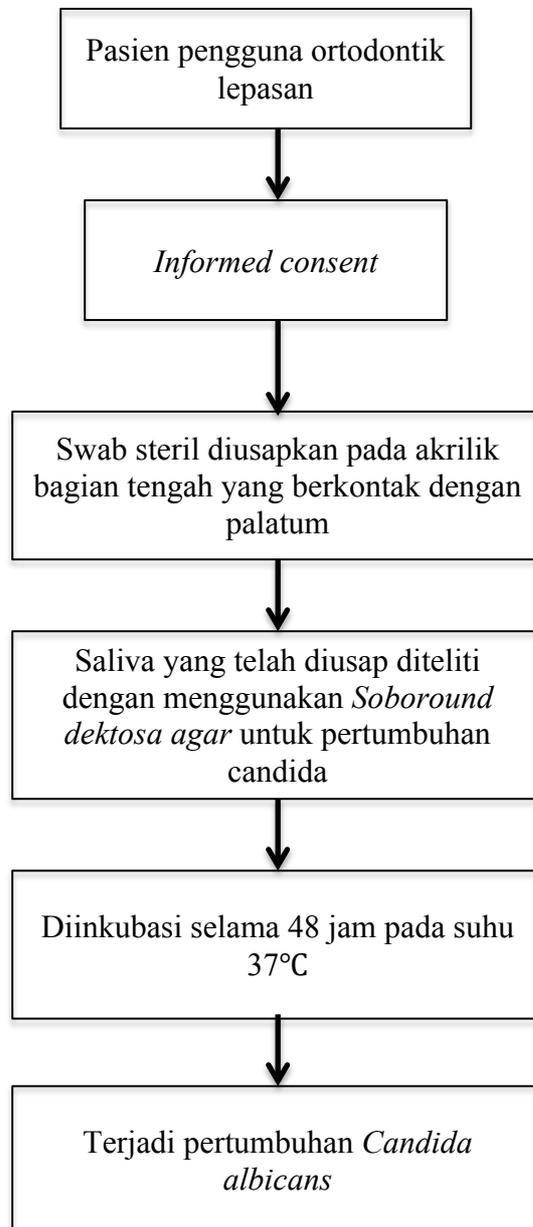
H. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Uji Normalitas Analitik *Shapiro Wilk*, karena jumlah sampel <50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berdasarkan populasi yang terdistribusi normal.

Uji efektifitas ekstrak dianalisis dengan menggunakan Uji Statistik *One Way Anova* atau *Kruskal Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan konsentrasi. Uji lanjutan dari *one way anova* adalah uji LSD (*Last Significance Difference*) untuk melihat pada konsentrasi berapa yang memiliki daya anti bakteri sama dengan control positif

I. Alur penelitian

1. Skema Kultur Mikroorganisme



2. Skema Jalannya Penelitian

